



DOCTORADO EN NEUROCIENCIA UAM

**INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA DEL TÁLAMO EN UN
MODELO PROGRESIVO DE ENFERMEDAD DE
PARKINSON EN PRIMATE NO HUMANO**

TESIS DOCTORAL

Autora: **Mariana Hernández González-Monje**

Directora: Carmen Cavada Martínez

Afiliación: Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia,
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid

Madrid, 2020

**INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA DEL TÁLAMO EN UN
MODELO PROGRESIVO DE ENFERMEDAD DE
PARKINSON EN PRIMATE NO HUMANO**

Trabajo de investigación que presenta

Mariana Hernández González-Monje

Para optar al grado de Doctor en Neurociencia de la

Universidad Autónoma de Madrid

dirigido por la Doctora

Carmen Cavada Martínez

Catedrática de Anatomía Humana y Neurociencia

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

2020

Carmen Cavada Martínez, Catedrática de Anatomía Humana y Neurociencia, en la Universidad Autónoma de Madrid

HACE CONSTAR:

Que Mariana Hernández González-Monje ha realizado bajo mi dirección los trabajos correspondientes a la Tesis Doctoral titulada “INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA DEL TÁLAMO EN UN MODELO PROGRESIVO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON EN PRIMATE NO HUMANO”, que ha terminado con el mayor aprovechamiento.

Revisado el presente trabajo, quedo conforme con su presentación para ser juzgado.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Madrid a 7 de Enero de 2020.

Fdo. Dra. Carmen Cavada Martínez

Este trabajo ha sido financiado por
la Cátedra UAM - Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno
de Docencia e Investigación en Neurociencia.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar dando las gracias a todos los miembros del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid que me han acompañado a lo largo de todos estos años. Aquellos que primero fueron mis profesores, y luego compañeros, el personal técnico de laboratorio y resto de compañeros investigadores pre y postdoctorales (con especial cariño al A37) han sido pieza clave en mi formación y crecimiento durante este período. Gracias por enseñarme y por transmitirme tanto. Ha sido una gran suerte haber compartido este camino.

Muy especialmente doy las gracias a mi directora de tesis, la doctora Carmen Cavada, por su cercanía, su dedicación y su rigor científico. Especialmente por favorecer el desarrollo en mí de esas grandes cualidades que debe tener todo investigador en ciencia, como describía el maestro Santiago Ramón y Cajal: la independencia de juicio, la curiosidad intelectual, la perseverancia en el trabajo y el amor a la ciencia.

De la misma manera, expreso mi agradecimiento a mis compañeros del HM-CINAC. Muy especialmente al doctor José Á. Obeso, por su confianza y dedicación, en cantidad y calidad, de ese tiempo que no tiene. Así mismo, doy las gracias al doctor Álvaro Sánchez Ferro, por su *mentoring and coaching*, fundamentales en esta nueva etapa en desarrollo.

No puedo olvidarme de mis compañeros, *amigos* de residencia, maestros y mentores neurólogos del Hospital Clínico San Carlos. Gracias a ellos descubrí mi vocación clínica, permitieron mi *neurodesarrollo* y me animaron siempre a seguir adelante con mi trayectoria investigadora. Entre ellos, muy especialmente dar las gracias a Alberto, el doctor Marcos; la banda sonora de este proyecto de tesis sería otra sin ti.

Por último, y no menos importantes, doy las gracias a mi queridísima familia y *amigos* (*de Canarias, facultad, residencia y vida!*), por ser un nido de confianza, seguridad y cariño incondicional, porque su apoyo y ayuda han sido fundamentales, porque solo ellos saben lo vivido para llegar hasta aquí.

RESUMEN

La pérdida de dopamina en la enfermedad de Parkinson (EP) afecta intensamente al sistema nigroestriatal. Esclarecer cómo la pérdida de dopamina afecta a las estructuras cerebrales más allá del estriado es, sin embargo, necesario para comprender mejor una serie de mecanismos patogénicos y manifestaciones clínicas de la enfermedad aun mal definidos.

El tálamo en primates está densa y heterogéneamente innervado por axones dopaminérgicos, la mayoría de los cuales expresan el transportador de dopamina (DAT), al igual que los del sistema nigroestriatal.

Nuestra hipótesis es que en el tálamo del cerebro parkinsoniano hay déficit de dopamina, que es variable en las diversas fases de la enfermedad, y que es heterogéneo en los diversos núcleos del tálamo.

Utilizamos tejido cerebral de macacos adultos sometidos o no a un protocolo de intoxicación lenta con la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Los macacos tratados con MPTP se distribuyeron en cuatro grupos según su estado motor: asintomático, recuperado, parkinsoniano leve y parkinsoniano grave. La innervación dopaminérgica fue estudiada mediante inmunohistoquímica frente a DAT. Realizamos mapas topográficos de la distribución de axones inmunoreactivos para DAT (DAT-ir) en el tálamo y estimamos la longitud total y la densidad de longitud de los axones DAT-ir utilizando un fraccionador 3D en los núcleos dorsomediano (MD), centromediano-parafascicular (CnMd-Pf), ventrales y reticular.

En comparación con los macacos control, los macacos tratados con MPTP mostraron una menor densidad de longitud axónica DAT-ir en los núcleos MD y CnMd-Pf. En MD la denervación de dopamina ya estaba presente en macacos del grupo asintomático. En el núcleo reticular, los macacos tratados con MPTP tuvieron un aumento de la densidad de longitud axónica DAT-ir en relación con los controles. La densidad de longitud de axones DAT-ir en los núcleos ventrales no mostró diferencias entre grupos.

Los resultados de nuestro trabajo muestran una reacción heterogénea al MPTP de los axones dopaminérgicos que innervan el tálamo. Los cambios en la innervación dopaminérgica talámica pueden contribuir a una disfunción en la transmisión talamocortical, talamoestriada, e intratálamica, y ayudan a explicar algunas manifestaciones motoras y no motoras de la EP, como defectos de función ejecutiva y de atención, así como trastornos del sueño.

ABSTRACT

Dopamine loss in Parkinson's disease (PD) affects intensely the nigrostriatal system. Understanding how dopamine loss affects brain structures beyond the striatum is, nonetheless, an unmet need to better understand a series of ill-defined pathogenic mechanisms and clinical manifestations in PD.

The primate thalamus is densely and heterogeneously innervated with dopaminergic axons, most of which express the dopamine transporter (DAT), as do the axons in the nigro-striatal system.

We hypothesized that dopamine depletion may be present in the thalamus of the parkinsonian brain, that it may change over the course of parkinsonism, and that there may be regional differences among the thalamic nuclei.

The toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) was administered to adult macaque monkeys using a slow intoxication protocol. The treated macaques were classified into four groups according to their motor status: asymptomatic, recovered, mild parkinsonian and severe parkinsonian. Dopamine innervation was studied with immunohistochemistry for DAT. Topography maps of DAT-ir axon distribution were generated and the total length and length density of DAT-ir axons in the mediodorsal (MD), centromedian-parafascicular (CnMd-Pf), ventral and reticular nuclei of the thalamus were stereologically estimated using a 3D fractionator.

Compared to controls, parkinsonian macaques exhibited less DAT-ir axonal length in the the MD and CnMd-Pf nuclei. In MD the dopamine denervation was already present in macaques that were asymptomatic at the time of sacrifice. Parkinsonian macaques had an increase of DAT-ir axon length density in the reticular nucleus compared to controls. DAT-ir axon length density in the ventral nuclei did not show differences between groups.

The above results show a diverse reaction to MPTP of the dopaminergic axons innervating the thalamus. This may result in dysfunction of thalamocortical, thalamostriatal and intrathalamic transmission, and may be explain some poorly-understood non-motor manifestations of PD, such as attention and executive deficits, and sleep impairment.

ABREVIATURAS

5-HT: serotonina
6-OHDA: 6-hidroxidopamina
AChE: acetilcolinesterasa
AD: núcleo anterodorsal
AM: núcleo anteromedial
AV: núcleo anteroventral
Bcs: brachium del colículo superior
BST: núcleo de la cama de la estría terminal
Cd: núcleo caudado
Cdc: núcleo central-parte densocelular
CeM: núcleo central medial
Ci: cápsula interna
Cim: núcleo central-parte intermedia
Cle: núcleo central-parte laterocelular
CL: núcleo central lateral
CM: núcleo centromediano
CnMd-Pf: complejo nuclear centromediano-parafascicular
Cs: núcleo central superior
Csl: núcleo central-parte superior lateral
DAB: di-amino-benzidina
DAT: transportador de dopamina
DBH: dopamina beta hidroxilasa
DO: densidad óptica
EP: enfermedad de Parkinson
F: fórnix
GL: núcleo geniculado lateral
GLd: núcleo geniculado lateral dorsal
GM: núcleo geniculado medial
GMmc: núcleo geniculado medial-parte magnocelular
GMpc: núcleo geniculado medial-parte parvocelular
GPe: globo pálido externo
GPI: globo pálido interno
HL: núcleo habenular lateral
HLpc: núcleo habenular lateral- parte parvocelular
Hm: núcleo habenular medial
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*)
III: tercer ventrículo
Itp: pedúnculo talámico inferior
LD: núcleo lateral dorsal
Li: núcleo limitans
Lme: lámina medular externa
LP: núcleo lateral posterior
LPbN: núcleo parabraquial lateral
LPm: núcleo lateral posteromedial
MAO: monoamino oxidasa
MD: núcleo dorsomediano
MDdc: núcleo dorsomediano-parte densocelular
MDl: núcleo dorsomediano-sector lateral
MDm: núcleo dorsomediano-sector medial
MDmc: núcleo dorsomediano-parte medial o magnocelular
MDmf: núcleo dorsomediano-parte paralaminar o multiforme
MDpc: núcleo dorsomediano-parte lateral o parvocelular
MDp: núcleo dorsomediano-sector posterior
MDv: núcleo dorsomediano-sector ventral
MPDP: 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina
MPP+: ion 1-metil-4fenilpiridina
MPTP: 1 metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MV: núcleo medio ventral
NET: transportador de noradrenalina
NGS: suero normal de cabra
NRS: suero normal de conejo
PAG: sustancia gris periacueductal
PB: tampón fosfato
PBS: tampón fosfato salino
Pcn: núcleo paracentral
PET: tomografía de emisión de positrones
Pf: núcleo parafascicular
Po: núcleo posterior
Pt: núcleo paratenial
Put: putamen
Pulv: pulvinar
Pul I: núcleo pulvinar inferior
Pul L: núcleo pulvinar lateral
Pul M: núcleo pulvinar medial
Pul O: núcleo pulvinar porción oral
Pv: núcleo paraventricular
Pvc: núcleo paraventricular caudal
R: núcleo reticular
Re: núcleo reuniens
REM: rapid eye movements (movimientos rápidos de los ojos)

Sm: estría medular
SN: sustancia negra
SNc: sustancia negra compacta
SNr: sustancia negra reticulada
St: estría terminal
STN: núcleo subtalámico
Str: estriado
TB: tampón tris
TBS: tampón tris salino
TH: tirosina hidroxilasa
Thi: tracto habénulo-interpeduncular
Tmt: Tracto mamilotalámico
VA: núcleo ventral anterior
VAdc: núcleo ventral anterior-porción densocelular
VAmc: núcleo ventral anterior-porción magnocelular
VAp: núcleo ventral anterior-porción parvocelular
VAv: núcleo ventral anterior ventromedial
VIM: núcleo ventral intermedio
VL: núcleo ventral lateral
VLa: núcleo ventral lateral-parte anterior
VLc: núcleo ventral lateral-parte caudal
VLm: núcleo ventral lateral-parte medial
VLo: núcleo ventral lateral-parte oral
VLp: núcleo ventral lateral-parte posterior
VLps: núcleo ventral-pars postrema
VM: núcleo ventromedial
VMb: núcleo medial ventro basal
VMAT2: transportador vesicular de monoaminas tipo 2
VP: núcleo ventral posterior
VPI: núcleo ventral posterior inferior
VPLa: núcleo ventral posterior lateral-porción anterior
VPL: núcleo ventral posterior lateral
VPLc: núcleo ventral posterior lateral-porción caudal
VPLo: núcleo ventral posterior lateral-porción oral
VPLp: núcleo ventral posterior lateral-porción posterior
VPM: núcleo ventral posterior medial
VPMp: núcleo ventral posterior medial-porción parvocelular

VTa: área tegmental ventral
X: área X
Zi: zona incerta

ÍNDICE

ABREVIATURAS

I INTRODUCCIÓN.....	1
1. ENFERMEDAD DE PARKINSON	3
1.1. CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS	3
1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	4
1.3. CIRCUITO DE LOS GANGLIOS BASALES: ORGANIZACIÓN ANATOMOFUNCIONAL Y CAMBIOS EN EL PARKINSONISMO	6
1.4. MODELOS EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON	8
1.4.1. 6-hidroxidopamina	9
1.4.2. 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina	10
1.4.2.1. Modelo MPTP en primates no humanos	11
1.4.2.2. MPTP en humanos	13
2. EL TÁLAMO DE LOS PRIMATES	13
2.1. ORGANIZACIÓN CONECTIVA	14
2.1.1. Núcleos primarios y núcleos asociativos	14
2.1.2. Conexiones eferentes	16
2.1.2.1. Conexiones talamocorticales	16
2.1.2.2. Conexiones talamoestriatales	20
2.1.3. Conexiones aferentes	22
2.1.3.1. Sistemas moduladores	22
2.1.3.1.1. Sistema dopaminérgico	22
2.1.3.1.2. Sistema noradrenérgico	27
2.1.3.1.3. Sistema serotoninérgico	28
2.1.3.1.4. Sistema acetilcolinérgico	29
2.2. NÚCLEO DORSOMEDIANO	30
2.2.1. Conexiones	31
2.2.2. Inervación dopaminérgica	33
2.2.3. Función	34
2.3. COMPLEJO CENTROMEDIANO-PARAFASCICULAR	34

2.3.1. Conexiones	35
2.3.2. Inervación dopaminérgica	36
2.3.3. Función	36
2.4. NÚCLEOS VENTRALES DEL TÁLAMO MOTOR	37
2.4.1. Conexiones	39
2.4.2. Inervación dopaminérgica	41
2.4.3. Función	41
2.5. NÚCLEO RETICULAR	42
2.5.1. Conexiones	42
2.5.2. Inervación dopaminérgica	43
2.5.3. Función	43
3. TÁLAMO Y PARKINSONISMO	44
3.1. BIOQUÍMICA DEL TÁLAMO EN LA EP Y MODELO EXPERIMENTAL MPTP	44
3.1.1. Dopamina	44
3.1.2. Noradrenalina	45
3.1.3. Serotonina	45
3.1.4. Acetilcolina	47
3.2. PATOLOGÍA ESTRUCTURAL DEL TÁLAMO EN LA EP Y MODELO EXPERIMENTAL MPTP	48
3.2.1. Depósito de alfa sinucleína	48
3.2.2. Degeneración neuronal	49
3.3. FISIOPATOLOGÍA DEL TÁLAMO EN LA EP	51
II PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
III MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. ANIMALES	59
2. MÉTODOS	59
2.1. INTOXICACIÓN POR MPTP Y VALORACIÓN MOTORA	59
2.2. OBTENCIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL	61
2.2.1. Perfusión	61
2.3. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO	62

2.3.1. Corte de los bloques.....	62
2.3.2. Inmunohistoquímica frente al transportador de dopamina	63
2.4. PARCELACIÓN DEL TÁLAMO	63
2.5. ELABORACIÓN DE MAPAS DE LA DISTRIBUCIÓN DE AXONES DAT+	64
2.6. ESTUDIO ESTEREOLÓGICO	65
2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
IV RESULTADOS.....	71
1. DISTRIBUCIÓN DE LA INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA DEL TÁLAMO EN LOS MONOS MACACOS PARKINSONIZADOS.....	73
1.1. DISTRIBUCIÓN DE LA INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA EN EL NÚCLEO DORSOMEDIANO.....	75
1.2. DISTRIBUCIÓN DE LA INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA EN NÚCLEOS DEL CIRCUITO MOTOR DE LOS GANGLIOS BASALES.....	82
1.2.1. Complejo centromediano-parafascicular	82
1.2.2. Núcleos ventrales	82
1.3. DISTRIBUCIÓN DE LA INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA EN EL NÚCLEO RETICULAR.	85
1.4. MORFOLOGÍA DE LOS AXONES DAT+	85
2. ESTUDIO ESTEREOLÓGICO DE LA DENSIDAD DE LONGITUD DE AXONES DAT+	87
2.1. DENSIDAD DE LONGITUD DE AXONES DAT+ EN EL NÚCLEO DORSOMEDIANO	87
2.2. DENSIDAD DE LONGITUD DE AXONES DAT+ EN NÚCLEOS IMPLICADOS EN EL CIRCUITO MOTOR DE LOS GANGLIOS BASALES.....	88
2.2.1. Complejo centromediano-parafascicular	88
2.2.2. Núcleos ventrales	89
2.3. DENSIDAD DE LONGITUD DE AXONES DAT+ EN EL NÚCLEO RETICULAR.....	90
2.4. MONO CON SÍNDROME PARKINSONIANO AGUDO. DENSIDAD DE LONGITUD DE AXONES DAT+.....	91

2.5. RESUMEN DE LA DENSIDAD DE LONGITUD DE LOS AXONES DAT+	92
3. CORRELACIONES DE LA INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA EN LOS NÚCLEOS TALÁMICOS Y MODELOS PREDICTIVOS	93
V DISCUSIÓN	97
1. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS	99
1.1. EL MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON CON MPTP	99
1.2. INMUNODETECCIÓN DEL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA	100
1.3. ESTUDIO ESTEREOLÓGICO	101
2. LOS NÚCLEOS DEL TÁLAMO RESPONDEN HETEROGÉNEAMENTE A LA INTOXICACIÓN CON MPTP	101
3. MECANISMOS SUBYACENTES A LA RESPUESTA DE LOS AXONES DOPAMINÉRGICOS TALÁMICOS A LA INTOXICACIÓN CON MPTP	103
4. COMPARACIÓN CON ESTUDIOS PREVIOS	106
5. CONSECUENCIAS A NIVEL CELULAR DE LAS MODIFICACIONES EN CANTIDAD DE AXONES DAT+ EN EL TÁLAMO	108
6. IMPLICACIONES FUNCIONALES	109
VI CONCLUSIONES	113
VII BIBLIOGRAFÍA	117
VIII ANEXOS	137
• TABLAS	139
○ Tabla 1. Cuantificación estereológica	139
• PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	140
○ Protocolo 1. Histoquímica de Acetilcolinesterasa	140
○ Protocolo 2. Tinción de Nissl	141
○ Protocolo 3. Inmunohistoquímica frente a transportador de dopamina (DAT)	142
○ Protocolo 4. Limpieza y gelatinización de portaobjetos	143
○ Protocolo 5. Deshidratación de secciones	144

• TAMPONES Y SOLUCIONES	145
○ Tampón Tris/ Tris Buffer (TB) 0,1 M pH 7,6	145
○ Tampón Tris salino/ Tris Buffer Saline (TBS) 0,1 M pH 7,6.....	145
○ Tampón fosfato/ Phosphate Buffer (PB) 0,1 M pH 7,4	145
○ Tampón sodio citrato pH 6,0	145
○ Tampón acetato 0,2 M pH 6,0	146
○ Solución crioprotectora anticongelante	146

I. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, afectando al 1-3% de la población mayor de 65 años (Nussbaum and Ellis 2003; Van Den Eeden *et al.* 2003). Debido al envejecimiento poblacional, en las próximas décadas se estima un incremento significativo de la prevalencia a nivel mundial, pasando de 6,9 millones de personas con EP en 2015 a 14 millones en 2040 (Dorsey and Bloem 2018).

La EP se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta (SNc) con la consiguiente depleción de terminales dopaminérgicas en el estriado, que lleva al desarrollo de los síntomas motores parkinsonianos clásicos: bradicinesia, rigidez, temblor de reposo e inestabilidad de la marcha (Gelb *et al.* 1999; Postuma *et al.* 2015). La EP se caracteriza también clínicamente por la presencia de un amplio espectro de síntomas no motores (alteraciones gastrointestinales, disautonomía, alteraciones sensitivas, trastornos del sueño y síntomas neuropsiquiátricos), los cuales puede preceder en décadas al desarrollo de síntomas motores (Postuma *et al.* 2012; Schapira *et al.* 2017).

El tratamiento sintomático actual, centrado en terapias dopaminérgicas, estimulación cerebral profunda y fisioterapia, permite controlar los síntomas hasta fases avanzadas de la EP. No obstante, no se han desarrollado terapias modificadores de la enfermedad que permitan reducir la progresión de la misma o frenar el proceso neurodegenerativo subyacente (Oertel and Schulz 2016).

1.1. CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS

Desde el punto de vista anatomopatológico, la EP se caracteriza por la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la SNc (Ehringer and Hornykiewicz 1960) y por la presencia de inclusiones citoplasmáticas proteináceas en neuronas, llamadas cuerpos de Lewy (Hughes *et al.* 1993).

La degeneración de neuronas dopaminérgicas afecta principalmente a la región caudoventrolateral de la SNc (grupo dopaminérgico A9d), con un curso progresivo

hacia regiones rostradorsomediales de la SNc (Hirsch *et al.* 1988; Damier *et al.* 1999). Los síntomas motores de la EP aparecen cuando la depleción de neuronas dopaminérgicas de la SNc es del 50-60% y la reducción de terminaciones dopaminérgicas estriatales es del 70-80% (Bernheimer *et al.* 1973; Fearnley and Lees 1990). La afectación de otros grupos dopaminérgicos, como el área retrorrubral (A8) o el área tegmental ventral (*Ventral Tegmental Area*, VTA, A10), es menos acusada (Gibb and Lees 1988; Hirsch *et al.* 1988; Damier *et al.* 1999). El proceso neurodegenerativo en la EP ocurre también fuera de la SNc, existiendo afectación del *locus coeruleus*, el núcleo basal de Meynert, el núcleo pedunculopontino, el núcleo motor dorsal del vago, los núcleos del rafe, la amígdala y el hipocampo (Greenfield and Bosaquent 1953; Chan-Palay and Asan 1989; Halliday *et al.* 1990; Jellinger 1991, 1999).

Los cuerpos de Lewy están compuestos fundamentalmente por agregados de alfa sinucleína fosforilada (Spillantini *et al.* 1998), así como de otras proteínas como la ubiquitina y la proteína p62 (Kuusisto *et al.* 2003). En la EP, el depósito intracitoplasmático de los cuerpos de Lewy no se limita a la SNc (Den Hartog Jager and Bethlem 1960; Forno 1996). Se ha propuesto un patrón topográfico de progresión de los depósitos de los cuerpos de Lewy, con inicio en el bulbo raquídeo, con una progresión posterior con patrón caudocraneal, afectando a múltiples estructuras cerebrales (Braak *et al.* 2003). No obstante, la asociación entre los agregados de alfa sinucleína, la neurodegeneración y los síntomas clínicos no está del todo esclarecida (Gibb and Lees 1988; Kalia *et al.* 2013).

1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los síntomas motores clásicos de la EP fueron reconocidos como un componente fundamental de la enfermedad en la descripción inicial por James Parkinson en el siglo XIX (Parkinson 1817). Las manifestaciones motoras de la EP incluyen la tríada clásica de bradicinesia, rigidez muscular y temblor de reposo; así como la inestabilidad postural y la alteración de la marcha. Estas manifestaciones suelen tener un inicio unilateral y asimétrico, y tener una mejoría marcada con el tratamiento dopaminérgico (Postuma *et al.* 2015). La progresión y gravedad de los síntomas se relacionan estrechamente con el grado de afectación de la SNc (Ma *et al.* 1997; Kordower *et al.* 2013) (Figura 1).

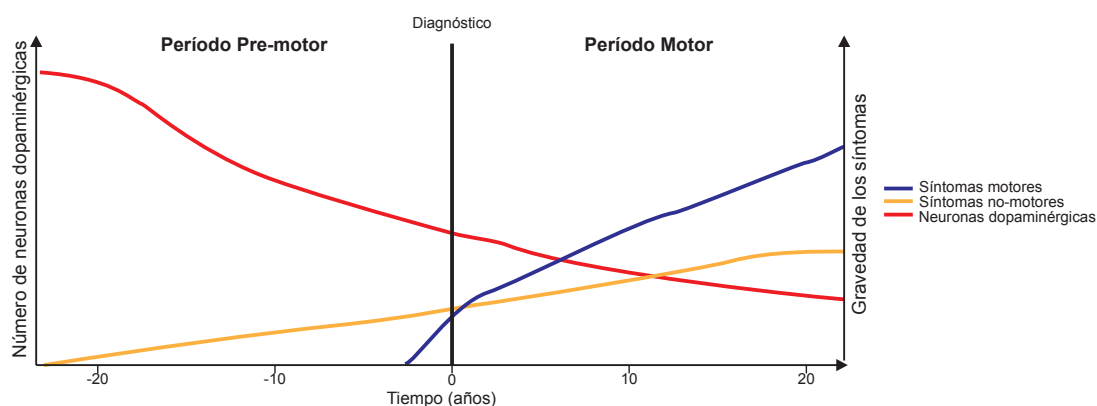


Figura 1. Representación esquemática de la relación del número de neuronas dopaminérgicas de la SNc y la gravedad de los síntomas en la evolución de la EP. El diagnóstico de la EP ocurre con el inicio de los síntomas motores (azul) (tiempo año 0), que aparecen décadas tras el inicio de la depleción de neuronas dopaminérgicas (rojo). Los síntomas no motores (naranja) preceden al desarrollo de síntomas motores. Los síntomas motores y no motores progresan con el avance de la enfermedad. Modificado de Kalia and Lang 2015.

Desde el punto de vista motor se puede diferenciar entre dos grandes subtipos clínicos: EP con predominio de temblor y EP sin predominio de temblor (aquellos en los que predomina un síndrome rígido-acinético y/o inestabilidad postural con alteración de la marcha) (Marras and Lang 2013). Se han descrito diferencias en el curso y pronóstico de la enfermedad entre estos subtipos de EP, que se han relacionado con posibles diferencias en su fisiopatología (Jankovic *et al.* 1990; Marras and Lang 2013).

Los síntomas no motores de la EP incluyen alteraciones gastrointestinales (como estreñimiento o retraso en el vaciamiento gástrico), disautonomía (como nicturia o disfunción sexual), alteraciones sensitivas (como anosmia o dolor), trastornos del sueño (trastornos del comportamiento del sueño REM o insomnio, entre otros) y síntomas neuropsiquiátricos (como depresión, apatía o déficits cognitivos) (Schapira *et al.* 2017). Los síntomas no motores suelen aparecer antes que los síntomas motores y están presentes en más del 90% de los pacientes a lo largo de la evolución de la enfermedad (Martinez-Martin *et al.* 2007; O'Sullivan *et al.* 2008).

El número de síntomas no motores y la gravedad de los mismos se incrementan con el avance y la duración de la enfermedad (Antonini *et al.* 2012) (Figura 1). Estos síntomas tienen un alto impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes, tanto o más que los síntomas motores (Schrag *et al.* 2000). Desde el punto de vista

anatomatológico, el desarrollo de alguno de los síntomas no motores se ha relacionado con el patrón de depósito de alfa sinucleína, el grado de depleción dopaminérgica y la afectación de otros sistemas, especialmente el noradrenérgico y serotoninérgico (Wolters and Braak 2006; Dickson *et al.* 2009).

El período premotor, o prodrómico, de la enfermedad se caracteriza por la presencia de síntomas y signos iniciales del proceso neurodegenerativo de la EP pero que son insuficientes para la realización del diagnóstico clínico (Berg *et al.* 2015). Este período prodrómico puede desarrollarse décadas antes del desarrollo del fenotipo motor parkinsoniano (Figura 1). Los síntomas no motores característicos de esta etapa son el estreñimiento, la hiposmia, los trastornos del sueño REM y la depresión (Schapira *et al.* 2017). El período premotor supone una ventana temporal fundamental para el estudio del proceso fisiopatológico de la enfermedad, así como para la aplicación de tratamientos modificadores que permitan la prevención o retraso del desarrollo y progresión de la EP.

1.3. CIRCUITO DE LOS GANGLIOS BASALES: ORGANIZACIÓN ANATOMOFUNCIONAL Y CAMBIOS EN EL PARKINSONISMO

Los ganglios basales intervienen en el control del movimiento, y también en funciones como el aprendizaje, la planificación, la memoria operativa y el procesamiento de emociones. En el circuito de los ganglios basales, más específicamente corteza cerebral-ganglios basales-tálamo-corteza cerebral, participan: el estriado, formado por los núcleos caudado, putamen y *accumbens* (también denominado estriado ventral); el globo pálido, con porciones externa (GPe) e interna (GPi); la sustancia negra, *pars reticulata* (SNr); el núcleo subtalámico (STN); el tálamo y la corteza cerebral. La actividad del estriado es, particularmente, modulada por otras proyecciones, fundamentalmente por las proyecciones dopaminérgicas de la SNc (Smith and Villalba 2008).

La mayor parte del conocimiento sobre la anatomía y fisiología de los ganglios basales y del circuito entre corteza - ganglios basales - tálamo - corteza proviene de estudios en el circuito motor. El circuito motor clásico de los ganglios basales comienza por las proyecciones glutamatérgicas desde áreas sensoriomotoras de la corteza cerebral o el tálamo, al estriado y STN. Estos transfieren la información a los núcleos de salida

del circuito de los ganglios basales, el GPi y la SNr. Las proyecciones del estriado son gabaérgicas y se dirigen al GPi y la SNr por dos vías separadas, la vía directa, con proyección monosináptica, y la vía indirecta, con proyección intercalada en el GPe y el STN (Figura 2). En suma, el balance final de ambas vías es una facilitación de la actividad talamocortical (Alexander *et al.* 1986). Existe una tercera vía, la hiperdirecta, descrita más recientemente. Esta vía comienza con las proyecciones glutamatérgicas de la corteza sensoriomotora sobre el STN, activándolo (Figura 2). El efecto de la vía hiperdirecta es disminuir la actividad de fondo del circuito de los ganglios basales antes de que la orden motora sea procesada por las vías directa e indirecta (Nambu *et al.* 2002; Coudé *et al.* 2018).

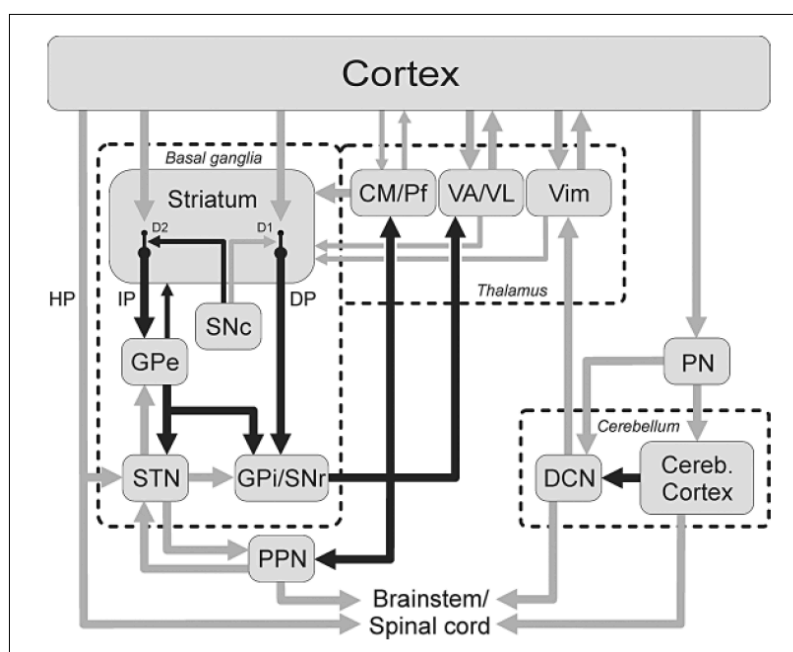


Figura 2. Circuitos motores corticosubcorticales implicados en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. Las flechas negras hacen referencia a conexiones inhibitorias, mientras que las flechas grises indican conexiones excitadoras. Abreviaturas: CM/Pf, núcleo centromediano-parafascicular; Cereb. Cortex, corteza cerebelosa; DCN, núcleos profundos del cerebelo; DP, vía directa; D1, receptores dopaminérgicos subtipo D1; D2, receptores dopaminérgicos subtipo D2; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; HP, vía hiperdirecta; IP, vía indirecta; PN, núcleo pontino; PPN, núcleo pedunculopontino; SNc, sustancia negra pars compacta; SNr, sustancia negra pars reticulata; STN, núcleo subtalámico; VA/VL, núcleo ventral anterior y ventral lateral del tálamo; Vim, núcleo ventral intermedio del tálamo. Tomado de Wichmann 2018.

En la EP y parkinsonismos experimentales, la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc provoca la denervación del estriado y de otras estructuras extraestriatales y, por consiguiente, la disregulación de la actividad del circuito motor de los ganglios basales (Alexander *et al.* 1986; Lavin and Grace 1998). Concretamente,

se produce un aumento de la actividad del GPi/SNr y con ello la inhibición de la transmisión talamocortical.

Además del circuito motor, existen otros circuitos paralelos cuyo patrón de conexiones es análogo al descrito para el circuito motor. En estos circuitos paralelos lo que varía son las áreas corticales implicadas y los territorios del estriado, globo pálido, SNr y STN que intervienen en cada uno de ellos (Alexander *et al.* 1986; Middleton and Strick 2000). De esta manera, se han descrito más en detalle otros dos circuitos además del motor: el circuito asociativo y el circuito límbico (Figura 3). Por otro lado, se ha identificado el circuito oculomotor, independiente del circuito motor (Alexander and Crutcher 1990).

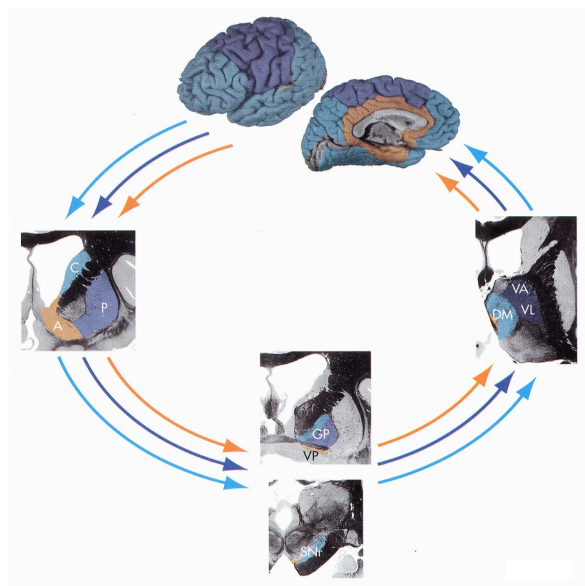


Figura 3. Ilustración esquemática de los circuitos paralelos de los ganglios basales. Las flechas reflejan el sentido de las proyecciones entre las distintas áreas cerebrales. Circuito sensoriomotor en color violeta, circuito asociativo en azul claro y circuito límbico en naranja. Nótese la topografía de las proyecciones a nivel de estriado y tálamo. Abreviaturas: A: núcleo accumbens, C: núcleo caudado, DM: núcleo dorsomediano, GP: globo pálido, P: núcleo putamen, SNr: sustancia negra reticulada, VA: núcleo ventral anterior, VL: núcleo ventral lateral, VP: pálido ventral. Tomado de Nolte 2002.

1.4. MODELOS EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

Los modelos animales de la EP basados en la administración de toxinas que afectan a las neuronas dopaminérgicas son los mejores para el estudio de la degeneración de la vía nigroestriada. Estos modelos experimentales han permitido

importantes avances en el conocimiento del funcionamiento de los ganglios basales y de la fisiopatología de la EP.

Los modelos experimentales basados en toxinas presentan, no obstante limitaciones. En primer lugar, la degeneración que se produce de la vía nigroestriada es rápida (días-semanas según el protocolo usado), a diferencia de la propia enfermedad que es un proceso progresivo, que dura décadas hasta el desarrollo de las manifestaciones motoras. Además, la intoxicación afecta de manera casi selectiva a las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y carece del desarrollo de los característicos cuerpos de Lewy (Blesa and Przedborski 2014).

La descripción de genes relacionados con formas familiares de la EP ha permitido el desarrollo de los modelos genéticos de la enfermedad. El uso de estos modelos permitiría estudiar mejor los mecanismos moleculares subyacentes a la patogenia de la EP familiar. No obstante, en el momento actual, los modelos genéticos no reproducen de forma adecuada las características clínicas y patológicas que se observan en las formas genéticas de EP (Dawson *et al.* 2010).

En este trabajo, presentamos las características de dos modelos de parkinsonismo inducidos con las neurotoxinas 6-hidroxidopamina y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

1.4.1. 6-hidroxidopamina

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) fue la primera neurotoxina usada para crear un modelo experimental de EP y se ha utilizado sobre todo en roedores (Blesa and Przedborski 2014). Al tratarse de una sustancia hidrofílica, no puede pasar la barrera hematoencefálica, precisando de la inyección estereotáxica local para inducir neurodegeneración dopaminérgica. La 6-OHDA tiene afinidad por el transportador de dopamina (DAT) y transportador de noradrenalina (NET) (Luthman *et al.* 1989), a través de los cuales pasa al interior celular donde se oxida produciendo especies reactivas de oxígeno y con ello el daño celular. La 6-OHDA produce una degeneración neuronal en la SNc y VTA (Sauer and Oertel 1994) generando un patrón de pérdida neuronal similar al que se produce en la EP.

1.4.2. 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

El modelo experimental de intoxicación con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es uno de los más utilizados, especialmente en primates. El MPTP es una meperidina, análoga de la heroína sintética. El MPTP fue sintetizado inicialmente por la compañía farmacéutica suiza Hoffmann-La Roche AG en 1947 para ser usado como un potente analgésico. Los estudios iniciales con esta sustancia se abandonaron ante la aparición de temblor e inmovilidad en monos de laboratorio, así como por la muerte de dos de los seis voluntarios humanos a los que se les había administrado el MPTP (Langston and Palfreman 2014). Al inicio de la década de los 80 del siglo XX, aparecieron en California (EEUU) casos de parkinsonismo agudo en jóvenes drogadictos en relación con la administración intravenosa de heroína contaminada (Langston *et al.* 1983). El estudio de estos pacientes permitió el aislamiento del MPTP como contaminante de la heroína, y su uso posterior para crear un modelo experimental de parkinsonismo en primates no humanos (Burns *et al.* 1983).

El MPTP es una molécula lipofílica que atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica. Posteriormente, el MPTP es biotransformado en una especie de piridina con carga positiva llamada 1-metil-4-fenilpiridina (MPP^+) (Chiba *et al.* 1984; Langston *et al.* 1984). Este proceso de oxidación está mediado por la monoaminoxidasa B (Heikkilä *et al.* 1984; Markey *et al.* 1984), y ocurre en células no dopaminérgicas, probablemente en los astrocitos (Javitch *et al.* 1985). Tras la transformación en MPP^+ , éste vuelve al espacio extracelular donde presenta gran afinidad por DAT, siendo transportado hacia el interior de las neuronas (Mayer *et al.* 1986) (Figura 4). Por eso, el acúmulo intraneuronal de MPP^+ depende del nivel de expresión de DAT (Mayer *et al.* 1986; Bezard *et al.* 1999). En el interior de las neuronas, el MPP^+ inhibe al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, produciendo toxicidad y muerte neuronal (Vyas *et al.* 1986). Así mismo, el MPP^+ puede permanecer en el interior del citosol e interactuar con proteínas citosólicas (Klaidman *et al.* 1993); o unirse con gran afinidad al transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) siendo transportado al interior de la vesícula sináptica (Liu, Peter, *et al.* 1992) (Figura 4). Así, la sobreexpresión de VMAT2 ha demostrado ser protectora frente al efecto tóxico del MPP^+ (Liu, Peter, *et al.* 1992; Liu, Roghani, *et al.* 1992). El ratio

DAT/VMAT2 se ha relacionado con la susceptibilidad neuronal al efecto del MPP⁺, así como con la vulnerabilidad neuronal y desarrollo de la EP en humanos (González-Hernández *et al.* 2004; Lohr *et al.* 2017).

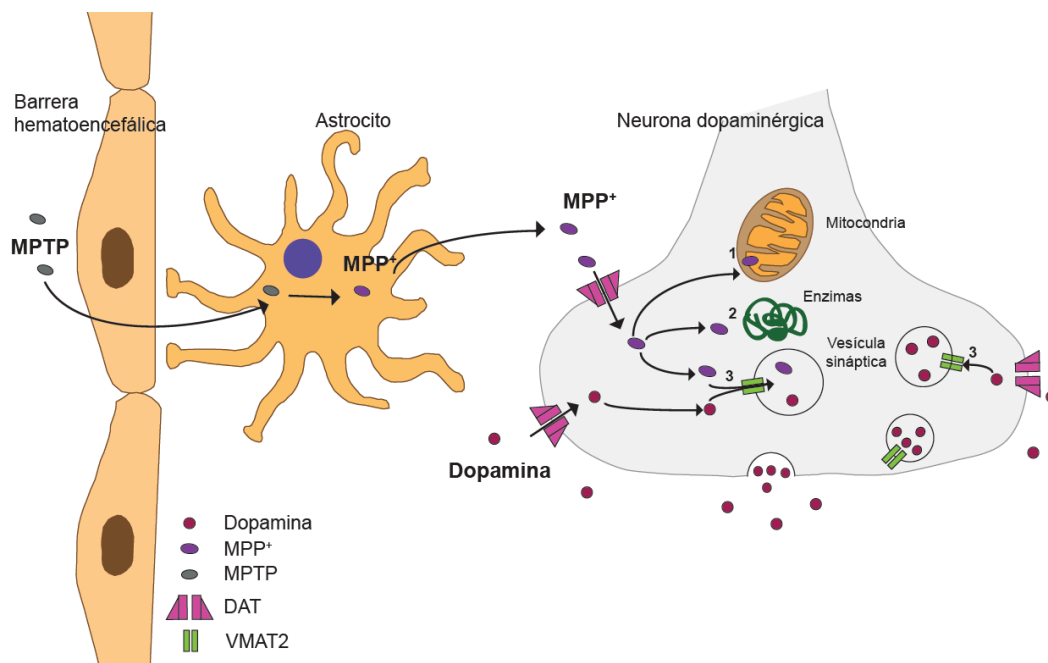


Figura 4. Esquema representativo de la acción del MPTP. El MPTP pasa la barrera hematoencefálica y es transformado en MPP⁺ en los astrocitos, tras lo cual es transportado al interior de las neuronas vía transportador de dopamina (DAT). En el interior de las neuronas el MPP⁺ inhibe al complejo I de cadena mitocondrial (1), se acumula en el interior celular realizando modificaciones enzimáticas (2) y es transportado al interior de las vesículas sinápticas vía transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) (3). La dopamina es recaptada de la terminal sináptica vía DAT. En el interior celular, la dopamina es reutilizada en las vesículas sinápticas vía VMAT2 (3). Basado en Dauer and Przedborski 2003; Lohr *et al.* 2017.

1.4.2.1. El modelo MPTP en primates no humanos

La similitud de los hallazgos anatomopatológicos y clínicos del modelo MPTP en primates no humanos con los de la EP hace que sea un modelo experimental ampliamente utilizado. Los protocolos de intoxicación crónica a dosis bajas permiten reproducir el carácter progresivo de la enfermedad, y con ello el estudio de la fase premotora o prodrómica de la enfermedad (Albanese *et al.* 1993; Bezard *et al.* 1997; Meissner *et al.* 2003; Blesa *et al.* 2010; Masilamoni *et al.* 2011).

La administración de MPTP en primates no humanos produce una pérdida selectiva y progresiva de neuronas dopaminérgicas. Esto se acompaña de un parkinsonismo que emula fenotípicamente a la EP, con disminución del parpadeo y de

la actividad espontánea, y desarrollo de rigidez y temblor (Burns *et al.* 1983). El patrón de afectación del sistema dopaminérgico es similar al observado en cerebros de pacientes con EP (Figura 5). Esto incluye una mayor pérdida celular en la SNc que en VTA (Schneider *et al.* 1987; Blesa *et al.* 2012) y la presencia de un gradiente de pérdida neuronal en la SNc, siendo mayor en las zonas ventro-laterales (Sirinathsinghji *et al.* 1992; Varastet *et al.* 1994). Así mismo, al igual que sucede en la EP, se presenta también con un patrón preferencial de degeneración de terminaciones dopaminérgicas en el putamen frente al núcleo caudado (Moratalla *et al.* 1992; Blesa *et al.* 2012).

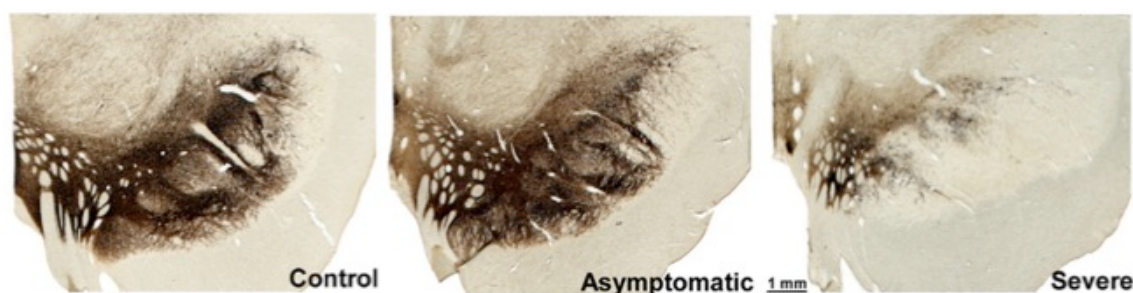


Figura 5. Patrón de pérdida de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en macaco. Se muestran secciones de inmunohistoquímica frente a tiroxina hidroxilasa de mesencefalo de un animal control y de monos macacos tratados con MPTP. Tomado de Blesa *et al.* 2012.

Frente a la gran afectación del sistema dopaminérgico, la alteración de sistemas no-dopaminérgicos en el modelo experimental con MPTP difiere a la de la EP (Mitchell *et al.* 1985; Pifl *et al.* 2013; Masilamoni *et al.* 2017). La falta de consistencia y reproducibilidad sobre las modificaciones que se producen en estos sistemas, podría estar en relación con la edad de los animales y la disparidad de protocolos de intoxicación utilizados en los distintos estudios (Forno *et al.* 1993; Masilamoni and Smith 2017).

Aunque se ha descrito la presencia de inclusiones citoplasmáticas en las neuronas de animales tratados con MPTP, no se ha constatado la presencia de los característicos cuerpos de Lewy de la EP; aun incluso en animales con largo tiempo de supervivencia tras la intoxicación con MPTP (Forno *et al.* 1993; Halliday *et al.* 2009).

Por último, cabe destacar la gran variabilidad interindividual de susceptibilidad al MPTP. Esto hace que, independientemente del protocolo de intoxicación que se aplique,

sea necesaria una dosificación individual del MPTP (Fox and Brotchie 2010; Blesa and Przedborski 2014).

1.4.2.2. MPTP en humanos

Los datos relativos al efecto del MPTP en humanos proceden, exclusivamente, del estudio de los jóvenes que desarrollaron un parkinsonismo grave tras la inyección intravenosa de un nuevo tipo de heroína sintética contaminada con MPTP (Langston *et al.* 1983). Estos sujetos desarrollaron un parkinsonismo de inicio agudo y curso crónico que remedaba clínicamente a la EP (Ballard *et al.* 1985). El análisis anatomopatológico *post mortem* de los cerebros, reveló una degeneración moderada-grave de la SNc, sin presencia de cuerpos de Lewy. Así mismo, se observaron áreas de gliosis y acúmulo de microglía en torno a las neuronas, sugerente de un proceso activo de neurodegeneración tras años desde la exposición puntual al MPTP (Langston *et al.* 1999).

2. EL TÁLAMO DE LOS PRIMATES

El tálamo es una estructura diencefálica par que se localiza caudal al agujero interventricular, a ambos lados del tercer ventrículo. El término tálamo (del griego “thalamos”: cámara interna o lecho nupcial) fue inicialmente usado por Galeno en su obra *De Usu Partium*. Comparaba así el cerebro humano con el plano de una casa griega, con el tálamo (o cámara interna) en el medio, enfatizando la localización y el rol central de esta estructura (Jones 2007).

En 1865, Jules Luys describió al tálamo como una estructura de relevo de información desde la periferia a la corteza cerebral. Desde esta descripción, prevaleció la idea del tálamo como núcleo de relevo sensitivo; se estableció así que la función primordial del tálamo era la de filtrar y transmitir información, fundamentalmente de carácter sensorial, a través de proyecciones focales y topográficamente dispuestas desde un núcleo talámico a un área concreta de la corteza cerebral (Jones 2007).

En la concepción actual, el tálamo se encarga no solo de procesar y transmitir información sensorial que llega desde la periferia a la corteza cerebral, sino también de transmitir información entre cortezas, a través de conexiones córtico-tálamo-corticales;

y de monitorizar la actividad motora a través de sus conexiones con los ganglios basales, el cerebelo y las cortezas motoras (Figura 6).

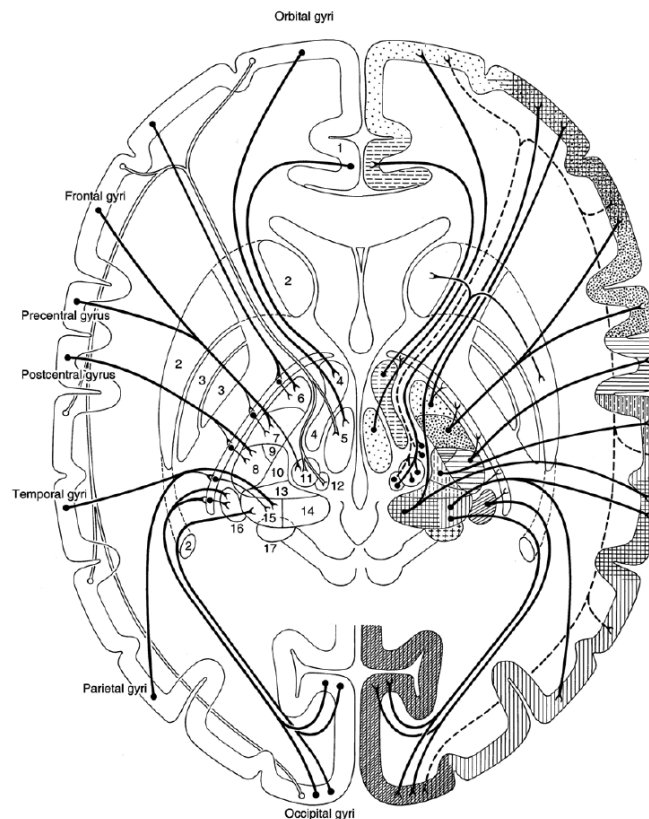


Figura 6. Extensión y complejidad de las conexiones corticotalámicas y talamocorticales en un corte esquemático axial del cerebro humano. En el hemisferio izquierdo se representan las conexiones corticotalámicas. En el hemisferio derecho se representa la distribución de las conexiones talamocorticales. Los núcleos talámicos y su correspondiente área cortical de proyección están representados con el mismo patrón de sombreado. Leyenda: 1: Circunvolución del cuerpo calloso; 2: cuerpo estriado; 3: globo pálido; 4: núcleo anterior del tálamo; 5: núcleo dorsomediano del tálamo; 6: núcleo ventral anterior del tálamo; 7: núcleo ventral lateral del tálamo; 8: núcleo ventral posterior del tálamo; 9: núcleo ventral posteriomedial; 10: núcleo lateral dorsal; 11: núcleo centromediano; 12: núcleo parafascicular; 13: núcleo lateral posterior; 14: núcleo pulvinar; 15: núcleo geniculado medial; 16: núcleo geniculado lateral. Tomado de Nieuwenhuys *et al.* 2008.

2.1. ORGANIZACIÓN CONECTIVA

2.1.1. Núcleos primarios y núcleos asociativos

Los núcleos talámicos se clasifican en dos grandes grupos en función de la procedencia de su principal aferencia o proyección aferente directriz (*driver input* según su denominación en inglés). La proyección aferente directriz es la aferencia glutamatérgica que transmite la información primaria específica para cada núcleo, que será procesada y transmitida desde ese núcleo a la corteza cerebral. La proyección

aferente directriz confiere a cada núcleo sus particulares propiedades funcionales. Los núcleos del tálamo pueden dividirse, en función de la aferencia directriz, en núcleos de primer orden y núcleos de orden superior (según su denominación en inglés, *first order nuclei* y *higher order nuclei*, respectivamente) (Sherman and Guillery 1998, 2006). Los núcleos de primer orden reciben su proyección aferente directriz desde estructuras subcorticales (Figura 7). Ejemplos de ello serían los núcleos de relevo sensitivo, los núcleos del grupo anterior y los núcleos ventrales del tálamo motor: núcleos ventral anterior (VA) y ventral lateral (VL), de particular interés para este trabajo. Todos ellos reciben su aferencia directriz desde estructuras subcorticales y proyectan a la corteza cerebral. Los núcleos de orden superior reciben su aferencia directriz desde la corteza cerebral, en concreto de neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral y, a su vez, proyectan a la corteza cerebral. Estos núcleos participan en la comunicación entre las distintas áreas de la corteza, y por ello, se conocen también como núcleos asociativos (Figura 7). El núcleo dorsomediano (MD), el núcleo centromediano-parafascicular (CnMd-Pf) o el núcleo pulvinar (Pulv) son ejemplos de ello (Sherman and Guillery 1998, 2006).

Adicionalmente, los núcleos de primer orden y los núcleos de orden superior reciben aferencias glutamatérgicas moduladoras desde la capa VI de la corteza cerebral, que modificarían el procesamiento de la información transmitida por la aferencia directriz (Sherman and Guillery 1998, 2006) (Figura 7).

Cabe destacar que en esta clasificación como núcleos de primer orden y orden superior no se incluye el núcleo reticular (R) del tálamo, el cual tiene una conectividad diferente al resto de núcleos talámicos. Este núcleo está compuesto por un único tipo celular: neuronas gabaérgicas que proyectan hacia el tálamo. El núcleo R recibe colaterales de las neuronas de proyección talamocortical; así como de las neuronas de la capa VI de la corteza que proyectan al tálamo. De esta manera, el núcleo R recibe información de todas las proyecciones que llegan y parten del tálamo hacia la corteza, salvo de las proyecciones de las neuronas corticotálamicas desde capa V cortical o aferencias directrices corticales (Sherman and Guillery 1998, 2006) (Figura 7).

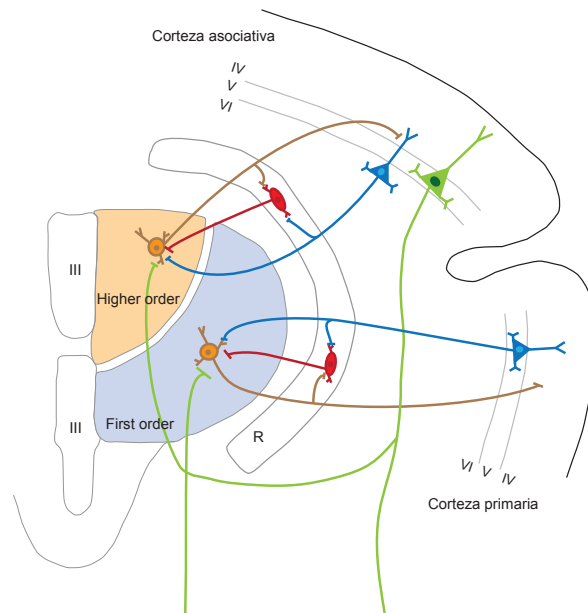


Figura 7. Representación esquemática de la conectividad del tálamo. Los núcleos de primer orden (*first order nuclei*) reciben la aferencia directriz (verde) desde estructuras subcorticales, mientras que los núcleos de orden superior (*higher order nuclei*) la reciben desde la capa V de la corteza cerebral. Todos los núcleos reciben aferencias modulatorias (azul) desde capa VI de corteza cerebral. Las neuronas del núcleo reticular (rojo) reciben colaterales de las neuronas de proyección talámica (marrón) y de las neuronas piramidales de la capa VI de corteza cerebral, no así de las aferencias directrices corticales. Abreviaturas: III, tercer ventrículo; R, núcleo reticular; IV, capa VI de corteza cerebral; V, capa V de corteza cerebral; VI, capa VI de corteza cerebral. Modificado de Sherman and Guillery, 1998.

2.1.2. Conexiones eferentes

Las proyecciones talamocorticales constituyen las principales, casi exclusivas, eferencias del tálamo; si bien el tálamo también está conectado con otras estructuras telencefálicas como el estriado, la amígdala y el hipocampo.

2.1.2.1. Conexiones talamocorticales

Las proyecciones talamocorticales constituyen las principales eferencias del tálamo. Estas proyecciones constituyen la vía de entrada en la corteza cerebral de toda la información sensorial transmitida desde estructuras subcorticales. Así mismo, suponen la reentrada en la corteza de información motora desde los ganglios basales y el cerebelo; y como se ha mencionado anteriormente, una forma de transmisión de información entre distintas áreas corticales. Todos los núcleos del tálamo, excepto el núcleo R, proyectan a la corteza cerebral. Todas las áreas de la corteza cerebral reciben proyecciones del tálamo y proyectan al mismo. La naturaleza de la proyección

talamocortical varía entre núcleos e incluso entre poblaciones celulares dentro de un mismo núcleo (Jones 2007).

Las conexiones talamocorticales han sido objeto de diversas clasificaciones en función de la localización de las terminaciones en corteza (Jones 2007). A finales del siglo XX, Edward Jones propuso una nueva clasificación de las neuronas talamocorticales basada en estudios en el tálamo de macacos (Jones 1998, 2001). Esta clasificación distingue dos tipos básicos de neuronas talamocorticales: neuronas tipo matriz y neuronas tipo *core*. Las neuronas tipo matriz se distribuyen por todo el tálamo, sin restringirse a los bordes nucleares o limitarse a ciertos núcleos. Estas neuronas tipo matriz se caracterizan por proyectar de forma difusa a la capa I de la corteza cerebral, proyectando a extensas regiones corticales. Las neuronas tipo *core* proyectan focalmente a capas intermedias corticales (capa IIIb y IV), abarcando regiones corticales menos extensas. Las neuronas tipo *core* se entremezclan con las tipo matriz, pero no están presentes en todos los núcleos del tálamo (Figura 8).

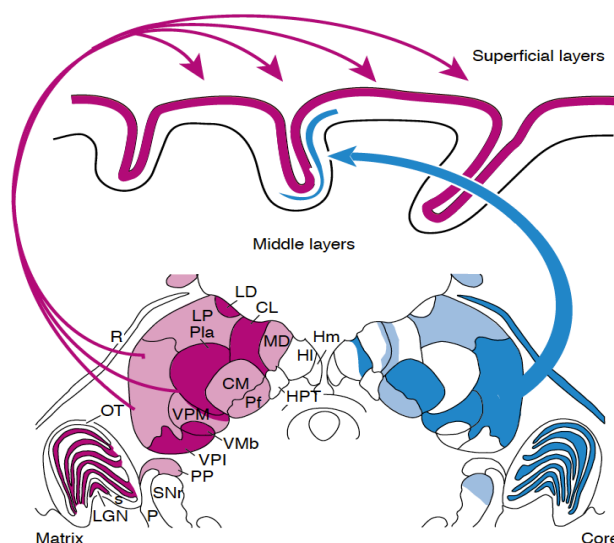


Figura 8. Conexiones talamocorticales. Representación de la distribución y concentración de las neuronas calbindina⁺ de la *matriz* (violeta) y de las neuronas parvalbúmina⁺ del *core* (azul) en una sección coronal del tálamo de macaco. La proyección desde la *matriz* a capas superficiales de la corteza ocurre de manera relativamente difusa y sin restricciones entre los bordes de distintas áreas corticales. Las neuronas *core*, restringidas a núcleos específicos, proyectan de manera topográficamente ordenada a capas intermedias de áreas corticales concretas. Abreviaturas: CL, núcleo central lateral; CM, núcleo centromediano; HI, habénula lateral; Hm, habénula medial; HPT, tracto habénulo-interpeduncular; LD, núcleo lateral dorsal; LGN, núcleo geniculado lateral; LP, núcleo lateral posterior; MD, núcleo dorsomediano; OT, tracto óptico; Pf, núcleo parafascicular; Pla, núcleo pulvinar anterior; P, pedúnculo cerebral; PP, núcleo pedunculopontino; R, núcleo reticular; SNr, sustancia negra reticulada; VPI, núcleo ventral posterior inferior; VMb, núcleo ventromedial porción basal; VPM, núcleo ventral posterior medial. Tomado de Jones 2001.

En el tálamo de primates las neuronas de proyección talamocorticales también se clasifican en función de su inmunorreactividad para dos proteínas ligadoras de calcio, parvalbúmina y calbindina 28kDa. Las neuronas tipo matriz suelen presentar tinción calbindina+, frente a las tipo *core* en las que predominan las neuronas parvalbúmina+. Así, las neuronas calbindina+ se distribuyen por todos los núcleos talámicos pero solo algunos núcleos tienen ciertas neuronas parvalbúmina+. Núcleos talámicos sin poblaciones neuronales tipo *core* parvalbúmina+ tienen mayor número de neuronas calbindina+ (Jones and Hendry 1989). Por ejemplo, en los núcleos ventral posterior medial (VPM) y CnMd-Pf hay poblaciones de neuronas parvalbúmina+, mientras que en los núcleos lateral dorsal (LD) o geniculado medial (GM) hay un predominio de población de neuronas calbindina+. La tinción específica para un tipo de proteína ligadora de calcio se acompaña a su vez de tinción de las fibras aferentes que terminan en ese núcleo para la misma proteína ligadora de calcio. Así, por ejemplo, el CnMd-Pf contienen una mayor proporción de células parvalbúmina+ y son inervadas por mayor proporción de fibras parvalbúmina+ (Jones 2001).

Por otra parte, en base al uso de técnicas de trazado de célula individual, hasta el momento realizado en su mayoría en roedores, se ha propuesto la clasificación de las proyecciones talamocorticales en cuatro tipos morfológicos básicos: las neuronas talamocorticales específicas, las neuronas talamocorticales inespecíficas, las neuronas talamocorticales multiespecíficas y las neuronas talamosubcorticales (Clascá *et al.* 2016) (Figura 9).

Las neuronas talamocorticales específicas inervan una única área cortical o a lo sumo dos áreas adyacentes sin dejar colaterales en ninguna estructura subcortical, a excepción del núcleo R. En la corteza cerebral arborizan densa y focalmente en las capas III y IV, y en el límite entre las capas Vb y VI de manera menos densa y más dispersa. Este morfotipo es el predominante en los núcleos primarios de relevo sensitivo y motores como el geniculado lateral dorsal o el VL (Clascá *et al.* 2016) (Figura 9).

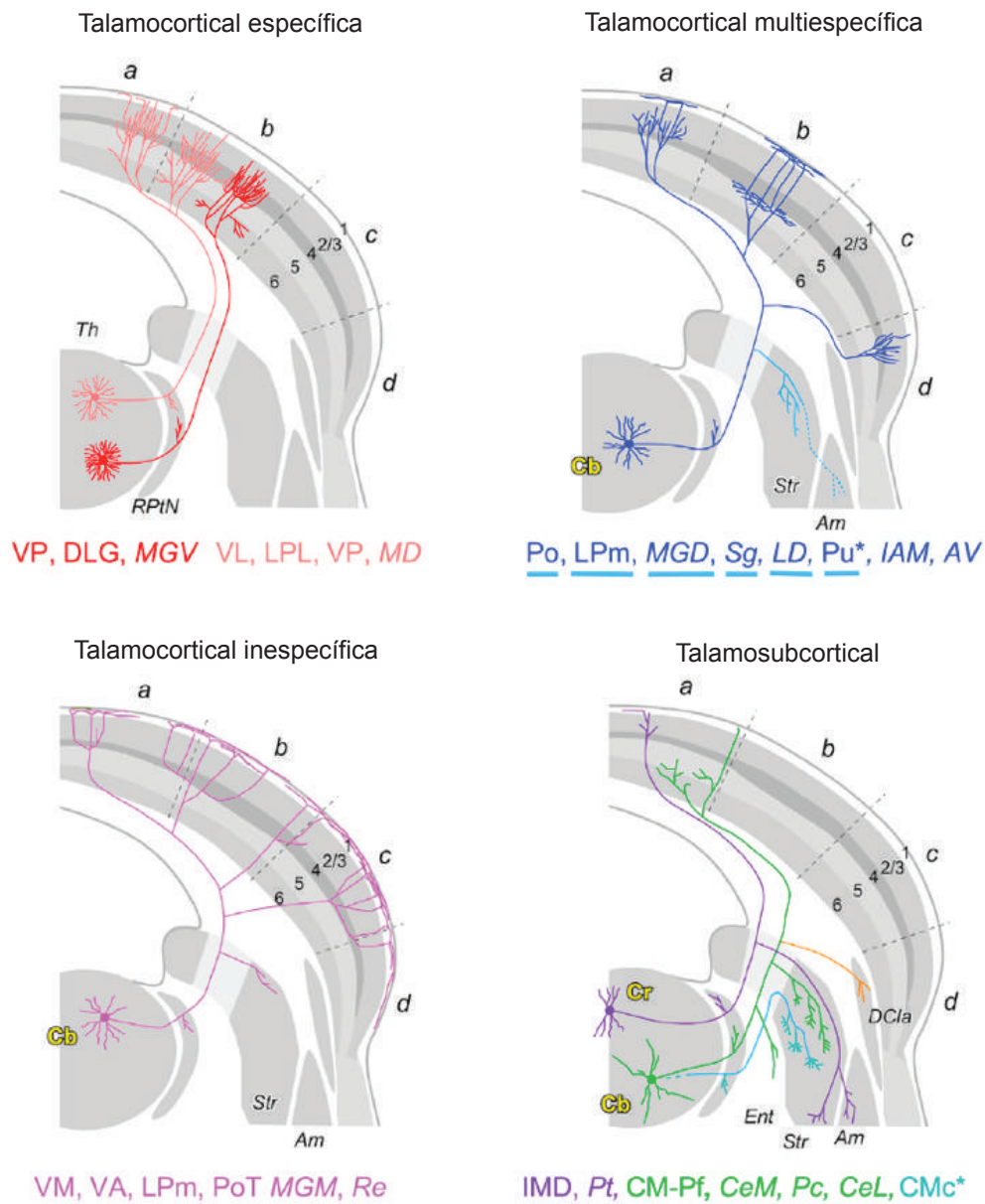


Figura 9. Representación esquemática de los cuatro morfotipos básicos de neuronas de proyección talámica. Nótese como algunos núcleos tienen más de un tipo neuronal. Cada grupo de núcleos se representa en un color, algunos núcleos están subrayados con un segundo color, indicando la presencia de una colateral adicional sobre una estructura subcortical concreta. Los números del 1-6 representan las capas de corteza cerebral. Se representan cuatro áreas ideales de corteza cerebral “a-d” separadas por líneas discontinuas. Las letras amarillas indican la expresión selectiva de calbindina (Cb) o calretinina en algunos tipos neuronales. Abreviaturas: Am, amígdala; AV, núcleo anteroventral; Cb, calbindina; CeL, núcleo central lateral; CeM, núcleo central medial; CM-Pf, núcleo centromediano-parafascicular; CMc, región core del núcleo centromediano; Cr, calretinina; DCla, claustró dorsal; DLG, núcleo geniculado dorsolateral; Ent, núcleo entopeduncular /globo pálido lateral; IAM, núcleo interanteromedial; IMD, núcleos intermediodorsales; LD, núcleo laterodorsal; LPL, núcleo lateral posterolateral; LPm, núcleo lateral posteromedial; MD, núcleo dorsomediano; MGD, núcleo geniculado medial, división dorsal; MGM, núcleo geniculado medial, división medial; MG, núcleo geniculado medial, división ventral; Pc, núcleo paracentral; Po, núcleo posterior, parte rostral; PoT, núcleo posterior, parte triangular; Pt, núcleo paratenial; Pu, núcleo complejo pulvinar; Re, núcleo reuniens; RPtN, núcleo reticular prethalamico; Sg, núcleo supragenicular; Str, estriado; Th, tálamo; VA, núcleo ventral anterior; VL, núcleo ventral lateral; VM, núcleo ventromedial; VP, núcleo ventral posterior. Tomado de Clascá *et al.*, 2016.

Los axones de las neuronas talamocorticales inespecíficas se extienden por regiones extensas de la corteza cerebral arborizando en la mitad externa de la capa I; aunque también pueden arborizar en el estriado, donde envían una colateral. Al inervar de forma preferente la capa I cortical, estas neuronas contactan con las dendritas apicales de las neuronas piramidales de las capas II-III y de las neuronas de la capa V que proyectan subcorticalmente. Estas terminaciones tienen un papel fundamental en la regulación de la comunicación córtico-cortical y córtico-subcortical de grandes territorios de corteza cerebral. Estas neuronas predominan en núcleos como el VM, VA y lateral posterior medial (LPm) (Clascá *et al.* 2016) (Figura 9).

Las neuronas talamocorticales multiespecíficas son aquellas que inervan focalmente varias áreas corticales, adyacentes o no, y en ocasiones también el estriado. El patrón laminar de arborización cortical de una misma neurona puede variar en las distintas áreas inervadas. Estas proyecciones permitirían una acción en paralelo pero de forma diferente entre distintas áreas corticales. Estas neuronas predominan en los núcleos lateral posterior (LP) o Pulv (Clascá *et al.* 2016) (Figura 9).

Las neuronas talamosubcorticales proyectan fundamentalmente al estriado (Figura 9). Por su relevancia en este trabajo se desarrollan en el siguiente apartado.

2.1.2.2. Conexiones talamoestriatales

La presencia de proyecciones talamoestriatales se sugirió a principios del siglo XX a partir de estudios en humanos. Estudios *post mortem* de cerebros humanos revelaron degeneración celular marcada en el complejo CnMd-Pf en aquellos cerebros que tenían lesiones en el estriado (McLardy 1948). Posteriormente, lesiones experimentales en el estriado de macacos mostraron una degeneración retrógrada intensa en el complejo CnMd-Pf, con menor grado de degeneración en otros núcleos talámicos (Powell and Cowan 1956). La existencia de conexiones talamoestriatales se comprobó de manera irrefutable mediante trazadores retrógrados (Jones and Leavitt 1974).

La principal fuente de las proyecciones talamoestriatales son los núcleos intralaminares del tálamo, concretamente el complejo CnMd-Pf. De hecho, ante la

importancia de la proyección talamoestriatal el núcleo centromediano recibió el nombre de “*einen Striatumanteil des Thalamus*” (un componente estriatal del tálamo). El complejo CnMd-Pf proyecta predominantemente, con una organización topográfica, a amplias regiones del estriado, y con una proyección relativamente menos intensa a la corteza cerebral (François *et al.* 1991; Sadikot, Parent, and François 1992; Parent and Parent 2005). Otros núcleos talámicos, como el VA y el VL, también proyectan al estriado (Giménez - Amaya *et al.* 1995; McFarland and Haber 2001). La proyección talamoestriatal que se origina en el CnMd-Pf es densa, focal y convergente en el estriado, predominantemente en áreas de la matriz estriatal (Sadikot, Parent, Smith, *et al.* 1992). Las proyecciones de núcleos no-CnMd-Pf son escasas y con una distribución difusa en el estriado, abarcando la matriz y los estriosomas (Fujiyama *et al.* 2006; Raju *et al.* 2006) (Figura 10).

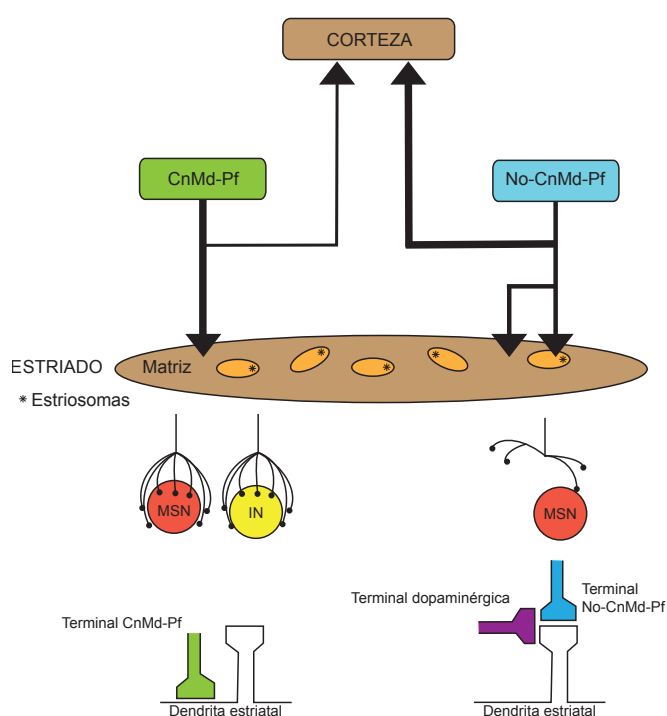


Figura 10. Representación esquemática del sistema dual talamoestriatal desde el complejo CnMd-Pf y núcleos No-CnMd-Pf. El tálamo proyecta al estriado con dos sistemas anatómicamente diferentes e independientes: desde el complejo CnMd-Pf y desde otros núcleos talámicos. En el esquema se muestran las principales diferencias anatómicas. Abreviaturas: CnMd-Pf, núcleo centromediano-parafascicular; No-CnMd-Pf, núcleos no-centromediano-parafascicular; MSN, Medium Spiny Neurons (neuronas espinosas de tamaño medio); IN, interneurons (interneuronas). Modificado de Galvan and Smith 2011.

Las conexiones talamoestriales presentan singularidades a nivel ultraestructural. La mayoría de las terminaciones provenientes del complejo CnMd-Pf realizan sinapsis asimétricas con las dendritas estriales, mientras que las proyecciones desde núcleos no-CnMd-Pf establecen contactos sinápticos con las espinas dendríticas de las neuronas estriales (Smith *et al.* 1994). Además, las terminaciones de núcleos no-CnMd-Pf convergen con proyecciones dopaminérgicas desde la SNc en espinas

dendríticas comunes, a diferencia de las terminaciones del complejo CnMd-Pf, que no muestran ninguna relación con las aferencias dopaminérgicas (Smith *et al.* 1994). Para revisión, ver Galvan and Smith 2011 (Figura 10).

2.1.3. Conexiones aferentes

La principal aferencia al tálamo la constituyen las proyecciones desde corteza cerebral, si bien el tálamo también recibe proyecciones subcorticales. Las proyecciones subcorticales llegan a través de vías específicas, como el tracto óptico, el lemnisco medial, o el brazo del colículo inferior; o de estructuras encefálicas como el estriado, el cerebelo o la amígdala (Asanuma *et al.* 1983; Ilinsky and Kultas - Ilinsky 1987; Barbas and De Olmos 1990). Así mismo, el tálamo recibe aferencias desde el tronco del encéfalo y prosencéfalo basal, que no tienen una organización topográfica concreta y que se distribuyen por todo el tálamo. Estas aferencias constituyen los sistemas moduladores del tálamo.

2.1.3.1. Sistemas moduladores

Los sistemas neuromoduladores del tálamo de primates incluyen el sistema dopaminérgico (Sánchez-González *et al.* 2005), el noradrenérgico (Morrison and Foote 1986), el acetilcolinérgico (Heckers *et al.* 1992), el sistema serotoninérgico (Lavoie and Parent 1991) o el histaminérgico (Manning *et al.* 1996). Estas aferencias ejercen una acción moduladora sobre la actividad talámica, es decir, participan en el procesamiento de la información pero no son el componente esencial del mensaje que será transmitido a la corteza cerebral.

2.1.3.1.1. Sistema dopaminérgico

La dopamina tiene un papel regulador sobre amplias regiones cerebrales, como la corteza, el estriado y la amígdala, donde ejerce importantes efectos moduladores sobre la excitabilidad neuronal (Nicola *et al.* 2000). La dopamina es importante en el control del movimiento (Agid 1991), la memoria operativa (Brozoski *et al.* 1979), el aprendizaje sensorimotor (Aosaki *et al.* 1994), el aprendizaje relacionado con la

recompensa y la motivación (Schultz 1998), así como en el sueño y la vigilia (Dzirasa *et al.* 2006).

El tálamo de roedores presenta una escasa innervación dopaminérgica (Groenewegen 1988; Papadopoulos and Parnavelas 1990; García-Cabezas *et al.* 2009). La concentración de dopamina en el tálamo de primates es escasa (Brown *et al.* 1979; Goldman-Rakic and Brown 1981; Pifl *et al.* 1990, 1991; Gerlach *et al.* 1996; Oke *et al.* 1997), y se creía que su presencia era como precursora de la noradrenalina, no como un sistema modular *per se*. Estos hechos condicionaron la falta de atención a la innervación dopaminérgica del tálamo de primates. La existencia de una amplia y heterogénea innervación dopaminérgica del tálamo de primates humanos y no humanos, fue descubierta por nuestro grupo mediante inmunohistoquímica frente a dopamina y DAT, y estudios con trazador retrógrado (Sánchez-González *et al.* 2005; García-Cabezas *et al.* 2007, 2009).

La innervación dopaminérgica del tálamo de primates tiene un origen múltiple, a diferencia de otros sistemas dopaminérgicos más sencillos. Esta innervación procede de grupos dopaminérgicos mesencefálicos (grupos A8, A9 y A10), de la sustancia gris periacueductal (PAG, A11), de grupos del hipotálamo (A12, A13, A14 y A15), y del núcleo parabraquial lateral (*LateroParabraquial Nuclei* LPbN) (Melchitzky and Lewis 2001; Sánchez-González *et al.* 2005) (Figura 11).

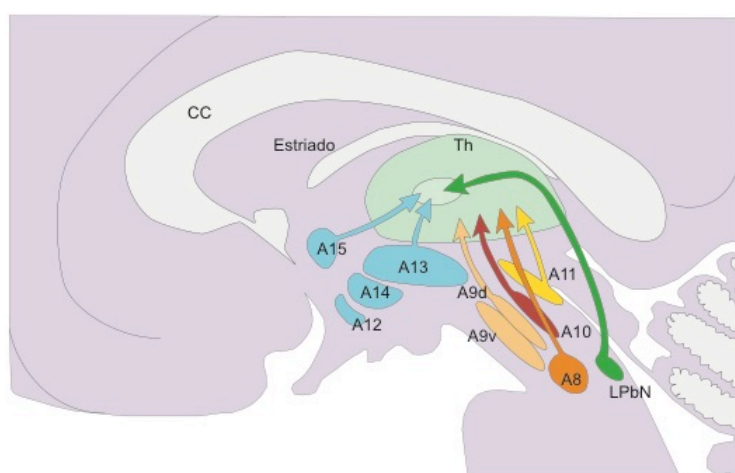


Figura 11. Sistema dopaminérgico talámico. Esquema representativo de las proyecciones dopaminérgicas aferentes al tálamo. Se representan en colores más cálidos los núcleos dopaminérgicos con mayor expresión de DAT (amarillo, naranjas y rojo) frente a los núcleos con menor expresión de DAT (colores azules y verde). Abreviaturas: CC, cuerpo calloso; Th, tálamo; LPbN, núcleo parabraquial lateral. Modificada de Craven 2005.

La distribución de la innervación dopaminérgica del tálamo de primates es muy compleja y heterogénea. Los núcleos asociativos talámicos como los núcleos de la línea

media, el MD y el LP, la parte medial del pulvinar (Pul M) así como el núcleo ventral lateral caudal (VLc) son los más densamente innervados, presentando una innervación dopaminérgica más densa que la de la corteza motora y prefrontal (Lewis *et al.* 2001; Sánchez-González *et al.* 2005; García-Cabezas *et al.* 2007). Otros núcleos, como los sensitivos geniculados presentan una menor innervación. El núcleo R presenta una marcada innervación dopaminérgica, predominantemente a nivel de la región dorsal del polo frontal (García-Cabezas *et al.* 2007) (Figuras 12 y 14A).

Existe cierta disociación en la distribución de terminales inmunorreactivas para dopamina y las inmunorreactivas para DAT. Los axones inmunorreactivos para dopamina se localizan predominantemente en los núcleos de la línea media, que tienen escasa inmunoreactividad para DAT, frente a núcleos fuera de la línea media que presentan marcada innervación DAT+ (García-Cabezas *et al.* 2007) (Figura 12A). Estas diferencias se relacionan con el distinto origen de la innervación dopaminérgica en estos núcleos (Sánchez-González *et al.* 2005) (Figura 13).

El tálamo humano también tiene una amplia innervación dopaminérgica. Esta es más densa en los núcleos de la línea media, los núcleos de asociación MD y LP y los núcleos motores ventrales (García-Cabezas *et al.* 2007) (Figura 12B).

Desde el punto de vista bioquímico, la concentración de dopamina en el tálamo de primates no humanos es menor comparada con otras estructuras cerebrales; y marcadamente inferior a la concentración de otros neurotransmisores (Piffl *et al.* 1991; Oke *et al.* 1997). El núcleo VA muestra la mayor concentración de dopamina, seguido del núcleo centromediano (CM), el ventralposterolateral (VPL) y el R. El núcleo VL y MD presentan concentraciones algo menores (Piffl *et al.* 2013) (Figura 14A'). Esta compleja y diversa innervación dopaminérgica del tálamo de primates, apoya la importancia de este sistema aminérgico en la modulación de las conexiones talámicas con corteza, estriado o amígdala; por eso el sistema dopaminérgico talámico es un sistema dopaminérgico adicional a los bien conocidos sistemas mesoestriatal y mesolímbico.

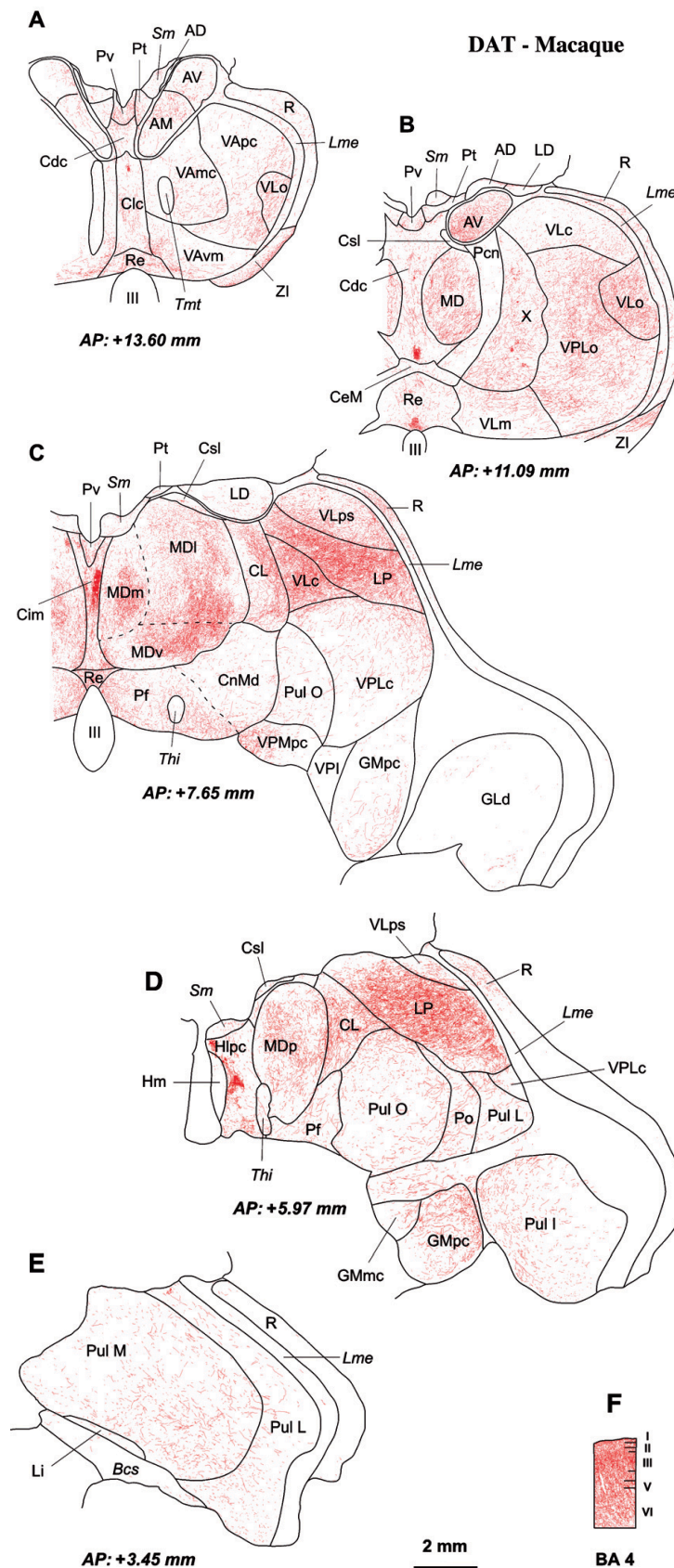


Figura 12A. Distribución de axones DAT⁺ en secciones coronales del tálamo de macaco. Nótese la heterogeneidad de distribución de los axones inmunorreactivos para DAT. La distancia respecto a la línea interaural se representa en la parte inferior. Abreviaturas: ver lista de abreviaturas. Tomado de García-Cabezas *et al.* 2007.

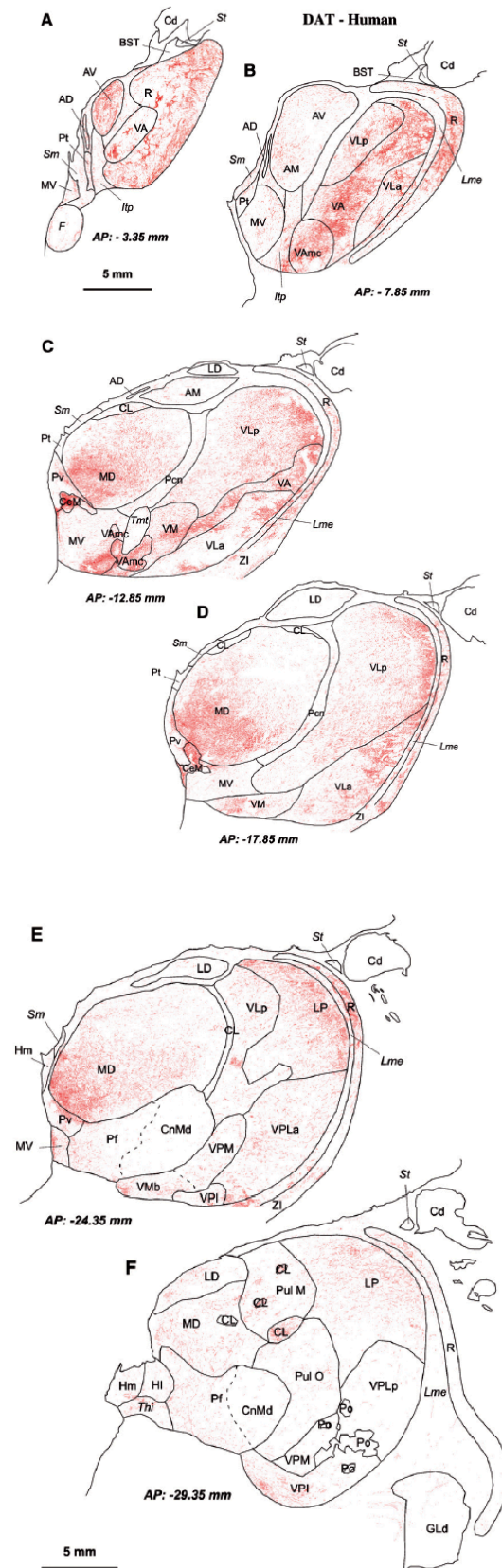


Figura 12B. Distribución de axones DAT+ en secciones coronales del tálamo humano. Nótese la heterogeneidad de distribución de los axones inmunorreactivos para DAT. Abreviaturas: ver lista de abreviaturas. Tomado de García-Cabezas *et al.* 2007.

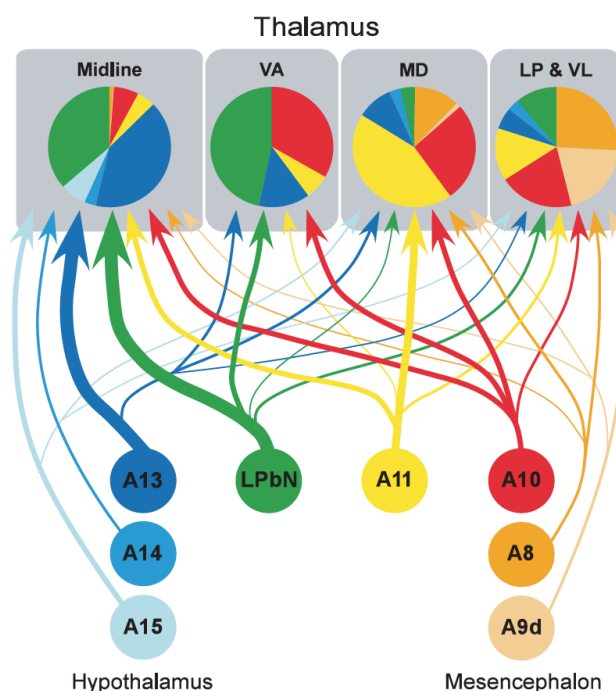


Figura 13. Esquema resumen de las proyecciones dopaminérgicas al tálamo de macaco. Los grupos dopaminérgicos inervan el tálamo con proyecciones heterogéneas a los distintos núcleos talámicos. En colores cálidos se representan los grupos dopaminérgicos que tienen expresión de DAT (A8, A9d, A10, A11). En colores fríos se representan los núcleos dopaminérgicos sin expresión de DAT (A13, A14, A15, LPbN). El grosor de las líneas se relaciona con la intensidad de la proyección dopaminérgica al tálamo. Abreviaturas: VA, núcleo ventral anterior; MD, núcleo dorsomediano; LP, núcleo lateral posterior; VL, núcleo ventral posterior; LPbN; núcleo lateral parabraquial. Tomado de Sánchez-González *et al.*, 2005.

2.1.3.1.2. Sistema noradrenérgico

La innervación noradrenérgica del tálamo de primates procede fundamentalmente del *locus ceruleus* (Bowden *et al.* 1978; Tanaka *et al.* 1982). Las aferencias noradrenérgicas participan en la regulación de la nocicepción a través del tálamo y la corteza cingular, y modulan las respuestas motoras asociadas a dicho procesamiento sensorial (Vogt *et al.* 2008).

En el tálamo de primates, los axones noradrenérgicos tienen una distribución heterogénea, siendo los núcleos de la línea media y los núcleos intralaminares los más densamente inervados (Vogt *et al.* 2008; Pérez-Santos and Cavada 2016). El núcleo MD presenta una elevada innervación en su porción más medial, seguido de los núcleos Pulv y LP que reciben una cantidad moderada de innervación noradrenérgica (Morrison and Foote 1986; Pérez-Santos and Cavada 2016). El conjunto de núcleos ventrales presenta una baja innervación, salvo el núcleo VA (Morrison and Foote 1986; Westlund *et al.*

1990; Pérez-Santos and Cavada 2016). Los núcleos sensitivos primarios presentan, así mismo, una limitada invasión noradrenérgica (Pérez-Santos and Cavada 2016) (Figura 14B).

La concentración de noradrenalina se ha analizado parcialmente en el tálamo de primates no humanos. Así, la mayor concentración de noradrenalina se localiza en el complejo CnMd-Pf, seguido muy cerca del VA y del núcleo R. La menor concentración la presentan los núcleos VL y VPL (Pifl *et al.* 2013) (Figura 14B').

El estudio más sistemático y completo de la invasión noradrenérgica del tálamo humano está basado en la detección de noradrenalina mediante cromatografía líquida. La concentración más elevada de noradrenalina se encuentra en los núcleos de la línea media y en las partes más ventrales del MD. También presentan concentraciones elevadas la subdivisión magnocelular de VA. La menor concentración de noradrenalina se encuentra en los núcleos sensitivos geniculado lateral (GL) y medial (GM) (Oke *et al.* 1997). Estudios posteriores en humanos han confirmado los hallazgos del grupo de Oke (Pifl *et al.* 2012).

2.1.3.1.3. Sistema serotoninérgico

La serotonina del tálamo modula la transmisión de información sensitiva (Andersen and Dafny 1983; Yang *et al.* 2014). El origen de la invasión serotoninérgica del tálamo procede fundamentalmente del núcleo dorsal del rafe mesencefálico (Moore *et al.* 1978; Chen *et al.* 1992).

En el tálamo de primates, la mayor cantidad de axones serotoninérgicos se localiza en los núcleos de la línea media y los intralaminares rostrales, seguido por el núcleo MD y el núcleo R. Los núcleos ventrales y el grupo anterior presentan una invasión algo menor y muy heterogénea (Morrison and Foote 1986; Lavoie and Parent 1991) (Figura 14C).

Este patrón de distribución de axones serotoninérgicos se corresponde, parcialmente, con el patrón de distribución de concentración de serotonina. Así, en primates no humanos, el CnMd-Pf presenta la mayor concentración de serotonina,

seguido muy cercanamente del VA; encontrando la menor concentración de serotonina con respecto a los núcleos estudiados en el VL y VPL (Pifl *et al.* 2013) (Figura 14C'). Este patrón de distribución de concentración de serotonina es similar al observado en el tálamo humano (Oke *et al.* 1997).

2.1.3.1.4. Sistema acetilcolinérgico

La innervación colinérgica del tálamo de primates procede de la porción caudal del núcleo pedunculopontino, del núcleo del tegmento dorsal lateral y del pálido ventral (Parent *et al.* 1988; Steriade *et al.* 1988). Al igual que sucede con los otros sistemas moduladores, la innervación colinérgica del tálamo de primates tiene una distribución difusa y heterogénea. En el tálamo de mono, los núcleos intralaminares, los núcleos de la línea media, el núcleo R, el núcleo anterodorsal y el MDm concentran la mayor cantidad de innervación colinérgica inferida por la actividad de acetilcolinesterasa (Cavada *et al.* 1995). Este patrón es similar al observado en el tálamo de humanos (Brandel *et al.* 1990; Heckers *et al.* 1992).

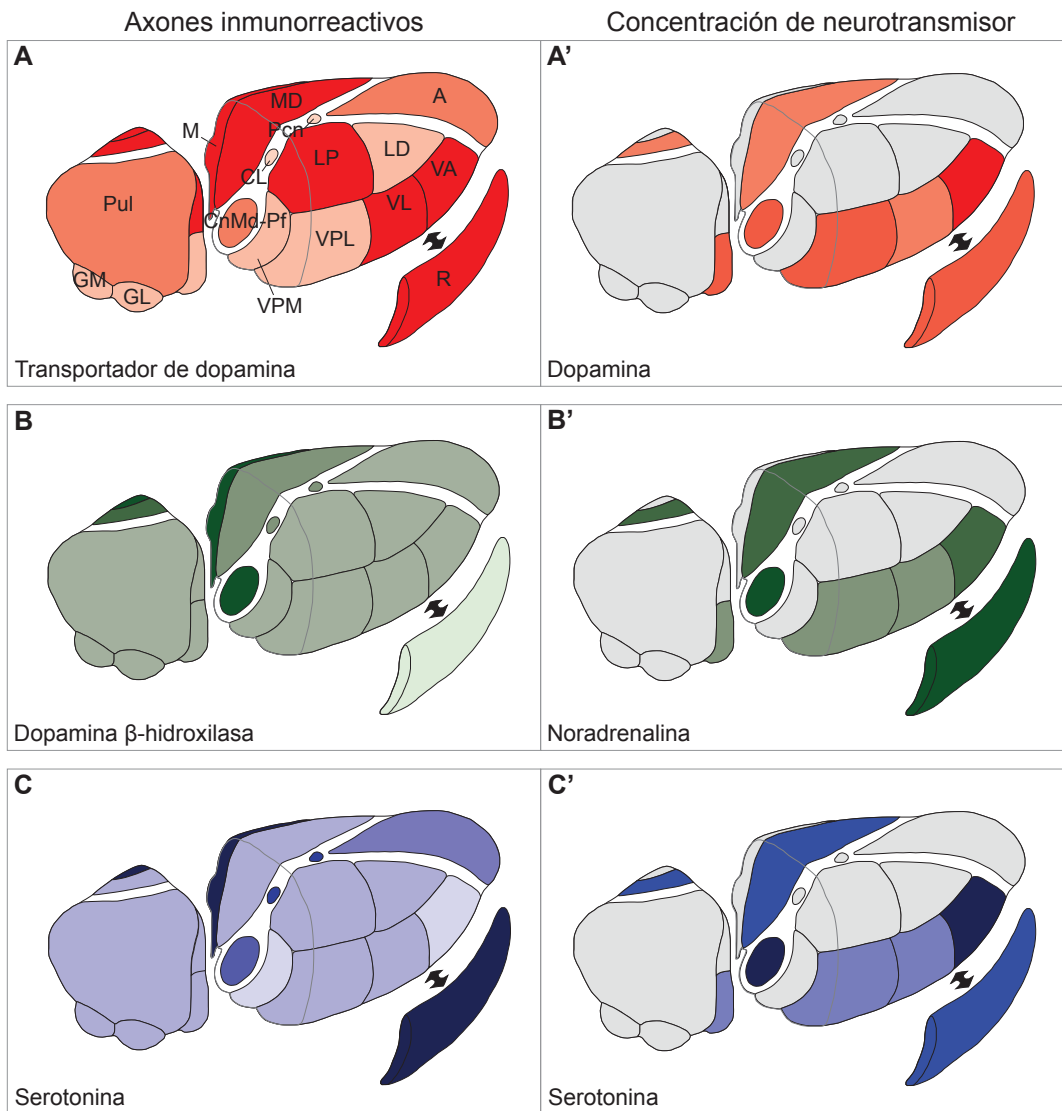


Figura 14. Representación gráfica de la distribución de axones y la distribución de concentración bioquímica de dopamina, noradrenalina y serotonina en el tálamo de mono. La intensidad del color representa la cantidad de axones inmunorreactivos para transportador de dopamina (DAT), dopamina β -hidroxilasa (D β H) y serotonina (5-HT) (A,B,C, respectivamente), así como la cantidad de concentración de dopamina, noradrenalina y serotonina en los distintos núcleos talámicos (A',B',C'). En gris se representan aquellos núcleos de los que se carece de información. Abreviaturas: A, grupo anterior; CL, núcleo central lateral; CnMd-Pf, complejo nuclear centro mediano-parafascicular; GL, núcleo geniculado lateral; GM, núcleo geniculado medial; M, núcleos de la línea media; MD, núcleo dorsomediano; LD, núcleo lateral dorsal; LP, núcleo lateral posterior; Pcn, núcleo paracentral; Pul, núcleo pulvinar; R, núcleo reticular; VA, núcleo ventral anterior; VL, núcleo ventral lateral; VPL, núcleo ventral posterior lateral; VPM, núcleo ventral posterior medial. Según datos de Lavoie and Parent 1991; García-Cabezas *et al.* 2007; Pifl *et al.* 2013; Pérez-Santos and Cavada 2016.

2.2. NÚCLEO DORSOMEDIANO

El núcleo MD está particularmente desarrollado en primates, en paralelo al desarrollo de la corteza prefrontal (Ferguson and Gao 2015). Se localiza en posición medial, abarcando el eje cráneo-caudal del tálamo, medial a la lámina medular interna.

En el núcleo MD se describen cuatro partes desde el punto de vista citoarquitectónico: la parte medial o magnocelular (MDmc), la parte lateral o parvocelular (MDpc), la parte paralaminar o multiforme (MDmf) y la parte posterior o densocelular (MDdc) (Olszewski 1952). Otra clasificación, en base a estudios histoquímicos (AChE) y conectivos, distingue: un sector medial (MDm), equivalente a la parte magnocelular; un sector lateral (MDl), equivalente a la parte parvocelular y multiforme; un sector ventral (MDv) equivalente a la parte ventral de las regiones magnocelular y parvocelular; y un sector posterior (MDp), que incluye la parte posterior o densocelular y la región más caudal de la parte magnocelular (Cavada *et al.* 1995).

2.2.1. Conexiones

El núcleo MD está conectado fundamentalmente con la corteza prefrontal, siendo el núcleo talámico que más proyecta a dicha corteza. En primates, la mayor proporción de conexiones se establece con la corteza prefrontal dorsolateral y orbitaria (Barbas *et al.* 1991). La mayor parte de las conexiones a corteza prefrontal dorsolateral se origina en el sector MDl, correspondiente predominantemente a la parte MDpc. Las conexiones a corteza prefrontal orbitaria se originan en neuronas del sector MDm (o MDmc); mientras que las proyecciones con corteza prefrontal dorsomedial se originan caudodorsalmente en el MD (porción caudodorsal del MDpc y MDm) (Goldman-Rakic and Porrino 1985; Ilinsky *et al.* 1985; Barbas *et al.* 1991; Cavada *et al.* 1995; McFarland and Haber 2002) (Figura 15). El sector MDl tiene a su vez conexiones con corteza premotora y motora suplementaria (Rouiller *et al.* 1999; Erickson and Lewis 2004); así como con la corteza cingular anterior (Vogt *et al.* 1987; Shibata and Yukie 2003), la ínsula (Mufson and Mesulam 1984) y el lóbulo parietal posterior (Schmahmann and Pandya 1990; Cappe *et al.* 2007).

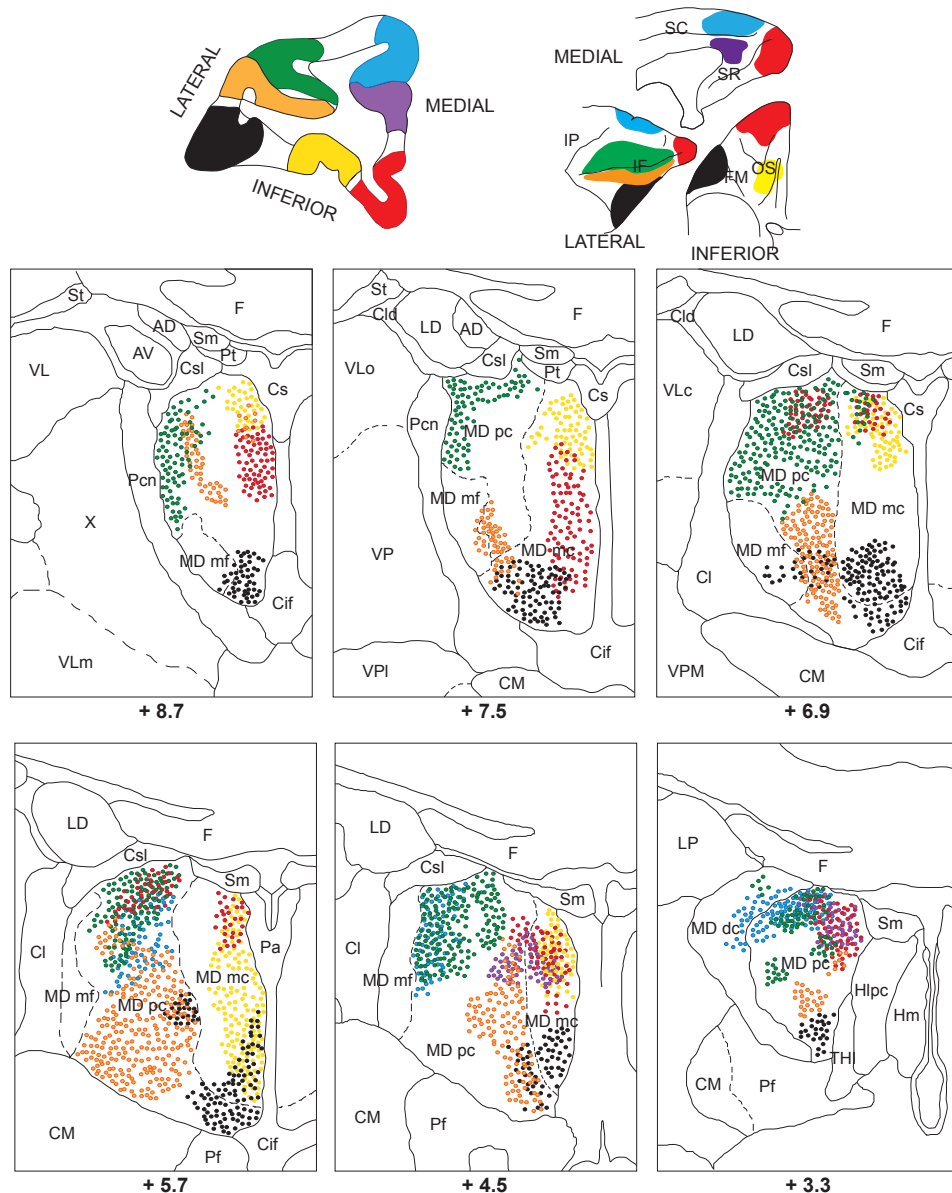


Figura 15. Representación esquemática de las proyecciones del núcleo dorsomediano a la corteza prefrontal. Arriba, corte coronal de la corteza prefrontal y visiones medial, lateral e inferior del lóbulo frontal. Los colores representan la localización de inyecciones de un trazador retrógrado usado para estudiar las conexiones con el núcleo dorsomediano. En los rectángulos se representan cortes coronales del tálamo centrados en el núcleo MD ordenados rostro-caudalmente. La distancia estereotóxica en el eje horizontal antero-posterior se indica debajo de cada imagen. Los puntos en MD representan las neuronas que proyectan a las áreas prefrontales inyectadas. Abreviaturas: AD, núcleo anterior dorsal; AV, núcleo anterior ventral; Cif, núcleo central inferior; Cl, núcleo central lateral; Cld, núcleo central lateral porción dorsal; CM, núcleo centro mediano; Cs, núcleo central superior; Csl, núcleo central superior porción lateral; F, fórnix; FM, surco frontal medial u orbitario medial; Hplc, núcleo habenular lateral porción parvocelular; Hm, núcleo habenular medial; IF, surco frontal inferior o surco principal; IP, surco inferior premotor o arcuato superior; LD, núcleo laterodorsal; LP, núcleo lateral posterior; MDdc, núcleo dorsomediano porción densocelular; MDmc, núcleo dorsomediano porción magnocelular; MDmf, núcleo dorsomediano porción multiformis; MDpc, núcleo dorsomediano porción parvocelular; OS, surco orbitario u orbitario lateral; Pa, núcleo paraventricular; Pcn, núcleo paracentral; Pf, núcleo parafascicular; SC, surco calloso marginal o cingulado; Sm, estría medular; SR, surco rostral; St, estría terminal; THI, tracto habénulo interpeduncular; VL, núcleo ventral lateral; VLc, núcleo ventral lateral porción caudal; VLM, núcleo ventral lateral medial; VLo, núcleo ventral lateral porción oral; VP, núcleo ventral posterior; VPI, núcleo ventral posterior inferior; VPM, núcleo ventral posterior medial; X, área X. Modificado de Goldman-Rakic and Porrino 1985.

Las conexiones talamocorticales del núcleo MD con corteza prefrontal son bilaterales y recíprocas (Akert and Hartmann-von Monakow 1980; Preuss and Goldman - Rakic 1987).

El MDmf y la porción dorsal del MDpc reciben aferencias desde el campo ocular frontal y corteza motora primaria (Akert and Hartmann-von Monakow 1980; Stanton *et al.* 1988); mientras que las porciones más lateroventrales del MD reciben proyecciones desde corteza premotora y área motora suplementaria (Akert and Hartmann-von Monakow 1980). Otras conexiones corticotalámicas con MD proceden de la corteza temporal anterior y medial, así como de la corteza parahipocampal, perirrinal y entorrinal (Russchen *et al.* 1987).

Por otra parte, el núcleo MD también presenta importantes conexiones subcorticales. La parte MDmf, del sector MDl, recibe una densa proyección desde la SNr; existiendo también pequeños focos de proyecciones nigrotalámicas a lo largo de toda la extensión del MD (Carpenter *et al.* 1976; Ilinsky *et al.* 1985). De esta manera, el MDmf, constituye parte del llamado “tálamo motor”. El sector MDl, por su parte, recibe proyecciones desde el área retrorubral, VTA, claustró, STN, colículo superior y cerebelo (Erickson *et al.* 2004; Calzavara *et al.* 2005); mientras que el MDm recibe proyecciones de la amígdala y prosencéfalo basal (Russchen *et al.* 1987).

2.2.2. Inervación dopaminérgica

La inervación dopaminérgica del MD proviene principalmente de A11 y también de A10, A8 y del grupo hipotalámico lateral (A13); y en cantidad casi indetectable de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, el LPbN y de la SNc (Sánchez-González *et al.* 2005) (Figura 13).

El núcleo MD es uno de los núcleos talámicos con mayor inervación dopaminérgica en los primates, tanto en el mono como en el humano (García-Cabezas *et al.* 2007). Esta inervación se distribuye de forma heterogénea entre los distintos sectores del MD. En el tálamo de macaco, la zona de máxima distribución de axones DAT+ se localiza en los dos tercios anteriores del núcleo, donde los sectores MDm,

MDl y MDv están claramente definidos. En esta región, las zonas de máxima inmunorreactividad se localizan en el MDm y en los territorios adyacentes de MDv y MDl; siendo la inervación moderada o débil fuera de esta zona. Los límites del sector MDp muestran una densidad moderada de axones DAT+ (García-Cabezas *et al.* 2007) (Figura 12A).

En el núcleo MD humano, la distribución de axones DAT+ es también marcadamente heterogénea. La zona ventromedial muestra un marcaje muy denso, desde la cual disminuye progresivamente a lo largo del eje medioventral hacia laterodorsal. En el límite posterior de MD la densidad es baja (García-Cabezas *et al.* 2007) (Figura 12B).

2.2.3. Función

La amplia conectividad del núcleo MD con corteza prefrontal explicaría la implicación de este núcleo talámico en funciones cognitivas. Estudios en primates no humanos han mostrado que el núcleo MD está implicado en procesos de atención y memoria operativa (Fuster and Alexander 1971, 1973; Tanibuchi and Goldman-Rakic 2003), así como en el aprendizaje mediado por la atención (Mitchell *et al.* 2007, 2008; Mitchell and Gaffan 2008). Por otra parte, también se ha relacionado con la olfacción (Yarita *et al.* 1980; Plailly *et al.* 2008) y la generación de movimientos oculares sacádicos (Tanibuchi and Goldman-Rakic 2003).

En humanos, la lesión del núcleo MD se asocia a déficits de atención y de memoria, a síndrome disejecutivo y alteración de la olfacción (Van Der Werf *et al.* 2000, 2003; Tham *et al.* 2011).

2.3. COMPLEJO CENTROMEDIANO-PARAFASCICULAR

El complejo CnMd-Pf, particularmente la porción Pf, es un núcleo ampliamente desarrollado en primates en comparación con roedores, y está conectado fundamentalmente con el estriado.

2.3.1. Conexiones

El núcleo CM inerva casi exclusivamente el putamen postcomisural, correspondiente al área sensoriomotora del estriado (Sadikot *et al.* 1990; Fénelon *et al.* 1991; François *et al.* 1991). Estas proyecciones contactan sobre neuronas estriatales que proyectan a la región ventrolateral del GPi, relacionadas con la vía directa del circuito motor de los ganglios basales (Sidibé and Smith 1996). A su vez, neuronas en esa misma región del GPi proyectan al CnMd-Pf cerrando el circuito (Kim *et al.* 1976; Fénelon *et al.* 1990; Sidibé *et al.* 1997) (Figura 16).

Por su parte, el núcleo Pf está conectado fundamentalmente con el putamen precomisural, con el núcleo caudado y núcleo *accumbens*, correspondientes a las áreas estriatales asociativas y límbicas (Sadikot, Parent, Smith, *et al.* 1992; Giménez - Amaya *et al.* 1995; Sidibé *et al.* 2002); y recibe proyecciones desde la región dorsal y rostromedial del GPi y la SNr (Sidibé *et al.* 2002) (Figura 16).

De esta manera, el complejo CnMd-Pf proyecta masiva y topográficamente sobre compartimentos funcionales del estriado: 1) el tercio rostral del núcleo Pf inervando predominantemente el núcleo *accumbens* (estriado límbico); 2) los dos tercios caudales del núcleo Pf proyectando al núcleo caudado y la porción dorsolateral del núcleo Pf proyectando al putamen anterior (estriado asociativo); y 3) los dos tercios mediales del núcleo CM inervando el putamen postcomisural (estriado sensoriomotor).

Las proyecciones talamocorticales desde el complejo CnMd-Pf arborizan de forma difusa en amplias regiones corticales, lo que permite que unos pocos axones modulen la actividad de un amplio número de neuronas corticales (Parent and Parent 2005). Las proyecciones con corteza se centran fundamentalmente en áreas motoras, incluyendo la corteza motora primaria, premotora y motora suplementaria, así como el campo ocular frontal y campo ocular suplementario (Künzle 1978; Akert and Hartmann-von Monakow 1980).

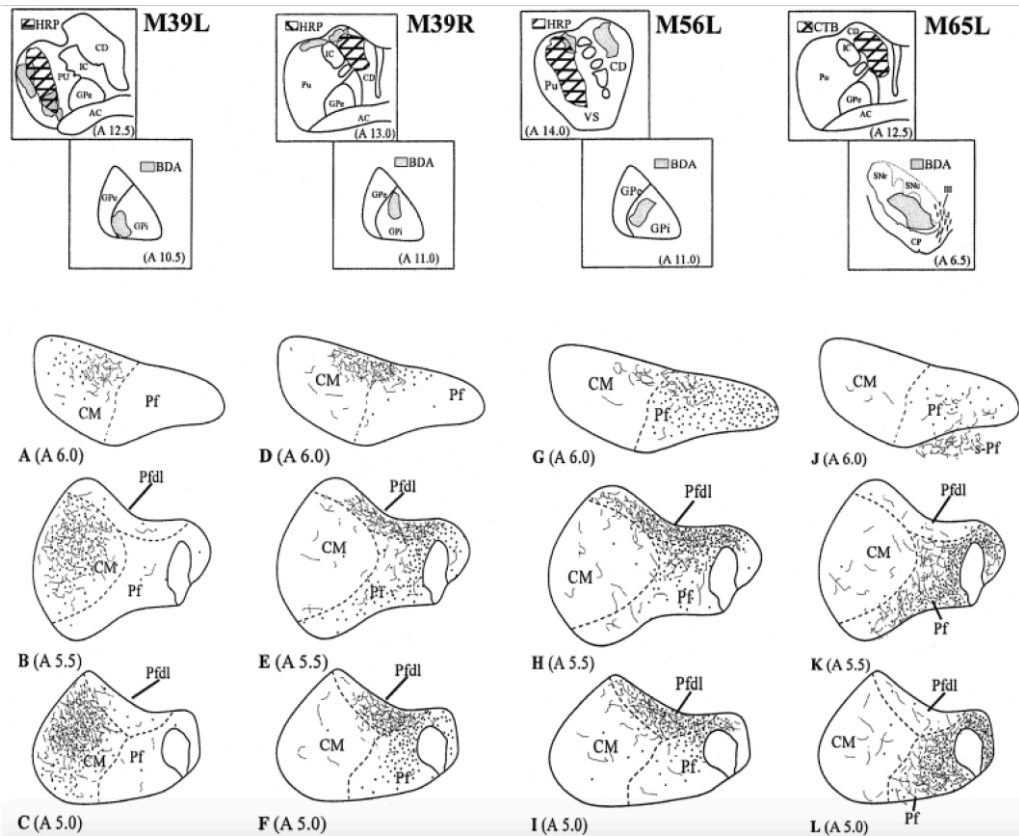


Figura 16. Ilustración representativa de las conexiones entre el GPi/SNr, el complejo CnMd-Pf del tálamo y el estriado. Se representan cortes coronales del complejo CnMd-Pf. En la parte inferior, se representa entre paréntesis la distancia respecto al eje inter-aural en milímetros. En líneas se muestran las fibras marcadas anterógradamente y los puntos representan las células marcadas retrógradamente tras inyecciones de BDA en GPi (A-I) o en la SNr (J-L) y de WGA-HRP o CTb en el estriado. Tomado de Sidibé *et al.* 2002.

2.3.2. Inervación dopaminérgica

En el tálamo de primates, la inervación dopaminérgica de los núcleos intralaminares es escasa, con excepción del núcleo Pf, donde los axones DAT+ se localizan principalmente en las regiones más ventromediales del núcleo; de manera similar a lo observado en el tálamo de humanos (García-Cabezas *et al.* 2007) (Figura 12). El origen de las proyecciones dopaminérgicas a este núcleo no es conocido.

2.3.3. Función

Como hemos comentado anteriormente, el complejo CnMd-Pf es, y con diferencia, la principal fuente de proyecciones talámicas al estriado. Sin embargo, la implicación funcional de las proyecciones talamoestriales no ha sido ampliamente estudiada y se desconoce su funcionalidad con exactitud.

No obstante, estudios en primates no humanos indican que las neuronas del complejo CnMd-Pf están implicadas en mecanismos atencionales mediante la regulación de la actividad de las interneuronas colinérgicas estriatales. La inactivación del complejo nuclear CnMd-Pf produce alteración en la realización de tareas atencionales en macacos entrenados (Minamimoto and Kimura 2002), y la mayoría de las neuronas del núcleo CM se activan cuando las condiciones de la tarea requieren un cambio en la respuesta tras un acontecimiento imprevisto. En base a ello, se ha propuesto que el complejo CnMd-Pf es relevante en redirigir la atención y cambiar el tipo de comportamiento en condiciones inesperadas (Minamimoto and Kimura 2002; Minamimoto *et al.* 2005).

2.4. NÚCLEOS VENTRALES DEL TÁLAMO MOTOR

El “tálamo motor” de primates está formado por la parte MDmf, el complejo CnMd-Pf y los núcleos ventrales VA y VL. Todos estos núcleos se encargan de transmitir información desde los ganglios basales a corteza motora, y de proyectar a estriado. Además, las proyecciones talamoestriatales convergen sobre aferencias al estriado desde cortezas motoras, confiriendo a estos núcleos un potencial papel modulador de la información motora.

El núcleo VA se localiza en el polo anterior de la masa de núcleos ventrales, caudalmente a la porción más anterior del núcleo R y anteromedialmente al VL. El núcleo VA de primates está compuesto por tres subdivisiones: magnocelular (VAmc), parvocelular (VApc) y densocelular (VAdc), de acuerdo con la nomenclatura de Ilinsky y Kultas-Ilinsky (1987). El VAdc se corresponde con la *pars oralis* del núcleo ventral lateral (VLo) según la parcelación de Olszewski (1952). Por su parte, el núcleo VL, siguiendo la nomenclatura de Olszewski (1952), se divide en ventral lateral caudal (VLc), ventral lateral pars postrema (VLps), área X y ventral posterolateral porción oral (VPLo) y el VLo.

La subdivisión VAmc es la mayor receptora de las proyecciones nigrotalámicas, en concreto de la SNr (Carpenter et al. 1976; Ilinsky et al. 1985; Ilinsky and Kultas - Ilinsky 1990). Las divisiones VApc y VLo reciben proyecciones desde el GPi (Kim *et*

al. 1976; Ilinsky and Kultas - Ilinsky 1987; Ilinsky *et al.* 1997; Sidibé *et al.* 1997) (Figura 17).

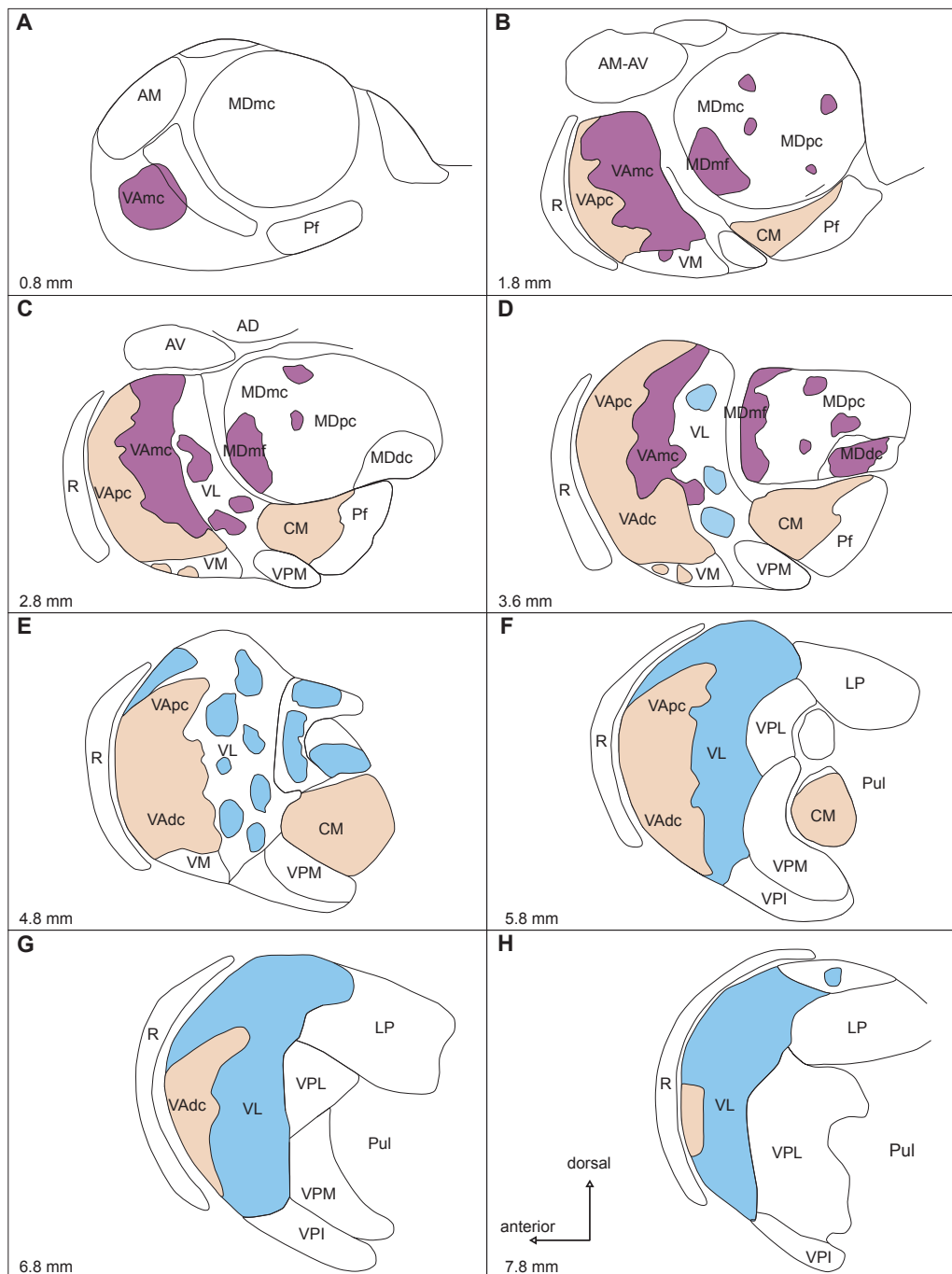


Figura 17. Proyecciones desde la sustancia negra reticulata, globo pálido interno y cerebelo al tálamo. Esquema representativo de las proyecciones desde SNr, GPi y cerebelo al tálamo de mono. Se representan cortes parasagítales consecutivos del tálamo de mono indicando en colores los principales territorios diana de las proyecciones desde SNr (violeta), GPi (salmón) y cerebelo (azul). La distancia respecto a la línea media se representa en el margen inferior izquierdo. Abreviaturas: AD, núcleo anterior dorsal; AM, núcleo anteriomedial; AV, núcleo anterior ventral; CM, núcleo centro mediano; LP, núcleo lateral posterior; MDdc, núcleo dorsomediano porción densocelular; MDmc, núcleo dorsomediano porción magnocelular; MDmf, núcleo dorsomediano porción multiformis; MDpc, núcleo dorsomediano porción parvocelular; Pf, núcleo parafascicular; Pul,

núcleo pulvinar; R, núcleo reticular; VAmc, núcleo ventral anterior porción magnocelular; VAdc, núcleo ventral anterior porción densocelular; VApc, núcleo ventral anterior porción parvocelular; VM, núcleo ventral medial; VL, núcleo ventral lateral; VPI, núcleo ventral posterior inferior; VPL, núcleo ventral posterior lateral; VPM, núcleo ventral posterior medial. Modificado de Ilinsky and Kultas-Ilinsky 1987.

Las subdivisiones del núcleo VL, excluyendo el VLo, tienen en común ser área de terminación de las proyecciones desde núcleos profundos del cerebelo (Asanuma *et al.* 1983; Calzavara *et al.* 2005). Así, el VLc, VLps, el área X y el VPLo son las principales dianas de la vía cerebelotalámica (Figura 17).

En resumen, las proyecciones cerebelotalámicas y pálido-talámicas se organizan con un patrón topográfico dentro del tálamo, si bien presentan cierto grado de solapamiento.

2.4.1. Conexiones

Las conexiones talamocorticales más importantes del VAmc son con cortezas frontales, en particular con la corteza orbitofrontal y el campo ocular frontal; mientras que el VApc conecta con el área motora pre-suplementaria, el área motora suplementaria y el área premotora (Ilinsky *et al.* 1985; Stanton *et al.* 1988; Barbas *et al.* 1991). El VLo proyecta preferentemente a la corteza motora suplementaria, y en menor medida a las corteza motora primaria y premotora lateral (Matelli *et al.* 1989; Matelli and Luppino 1996). Por su parte, el núcleo VPLo proyecta fundamentalmente a corteza motora primaria, mientras que el área X y VLo proyectan a la corteza motora suplementaria y en menor medida a la corteza motora primaria y la corteza motora cingular dorsal (Schell and Strick 1984; Ilinsky and Kultas - Ilinsky 1987; Matelli *et al.* 1989). Por tanto, existe una convergencia de los inputs cerebelo-tálamo-corticales y pálido-tálamo-corticales a nivel de la corteza motora suplementaria (Sakai *et al.* 2000).

Las proyecciones talamoestriatales desde VA/VLo están organizadas de una manera topográficamente funcional: territorios de VA/VLo interconectados con corteza motora frontal proyectan a la misma región del estriado dorsal. Así, el VA/VLo proyecta a amplias regiones del estriado dorsal, incluyendo cabeza de caudado y el putamen dorsal. El VAmc proyecta a áreas centrales y dorsales de cabeza de caudado, mientras que el VApc lo hace preferentemente con áreas más rostromediales del

putamen. Por su parte, el VLo proyecta principalmente a áreas dorsolaterales del putamen postcomisural (McFarland and Haber 2000, 2001). Pese a este patrón topográficamente organizado, las proyecciones talamocorticales con origen en distintos puntos del VA/VLo tienen un amplio grado de solapamiento en el estriado (Figura 18).

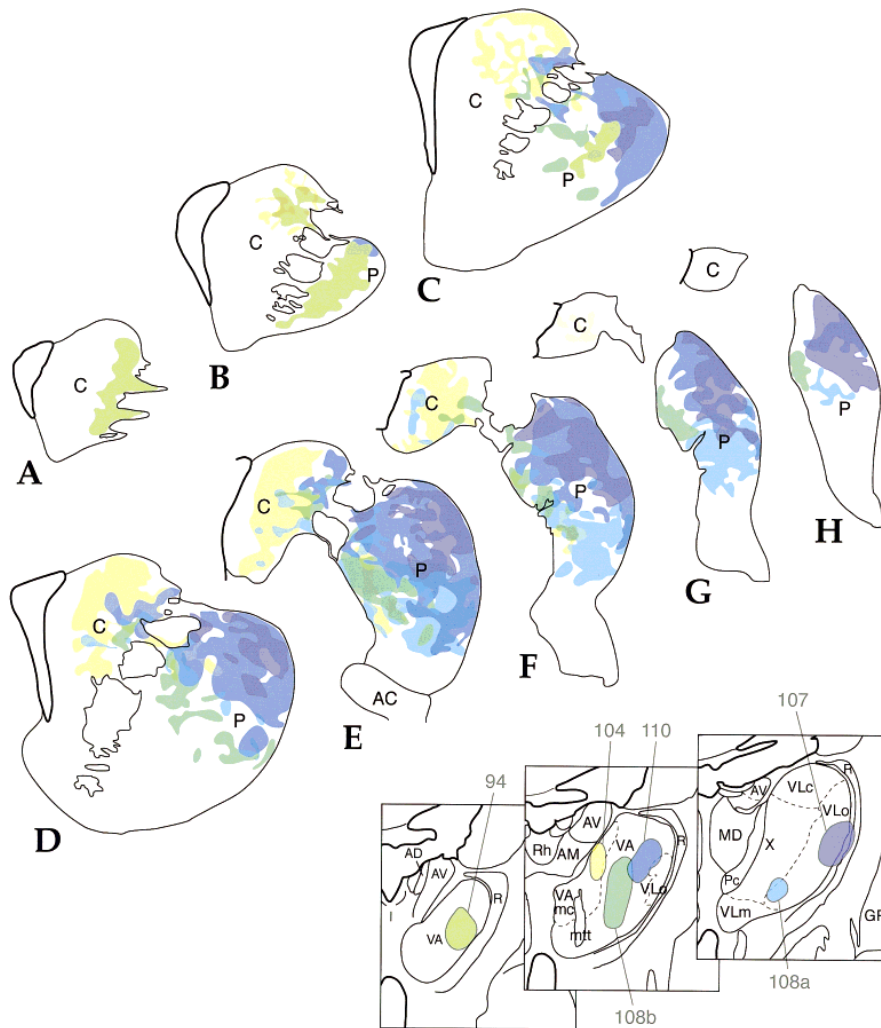


Figura 18. Representación esquemática de la distribución de las proyecciones talamoestriatales de los núcleos ventral anterior y ventral lateral. Se representan en sentido rostro-caudal (A-H) las distintas áreas del estriado que reciben proyecciones desde VA y VL. Los colores en las áreas del estriado corresponden con los colores de los lugares de las inyecciones en los núcleos VA y VL. Nótese la amplia distribución rostrocaudal de las proyecciones talamoestriatales desde los núcleos VA y VL en el estriado dorsal. Nótese también el grado de solapamiento en el estriado dorsal de las terminales talamoestriatales con origen en puntos cercanos en los núcleos VA y VL. Abreviaturas: C, caudado; P, putamen; AC, comisura anterior; AV, anteriorventral; AM, anteriomedial; AD, anteriordorsal; GPi, globo pálido interno; VA, ventral anterior; VAmc, ventral anterior magnocelular; mtt, tracto mamilotalámico; VLo, ventral lateral porción oral; VLc, ventral lateral porción caudal; VLm, ventral lateral porción medial; MD, dorsomediano; Pc, paracentral; R, reticular; Rh, núcleo romboides; X, área X. Tomado de McFarland *et al.* 2001.

Los territorios diana de VA/VL en el estriado reciben proyecciones desde áreas corticales que, a su vez, reciben proyecciones de VA/VL. De esta manera, regiones del

VL están interconectadas con áreas específicas de la corteza motora que proyecta al estriado sensoriomotor y que también recibe inputs de las mismas regiones corticales. Un patrón similar de conectividad ha sido sugerido entre el VA y cortezas asociativas frontales, y áreas concretas del núcleo caudado y putamen anterior (McFarland and Haber 2002).

2.4.2. Inervación dopaminérgica

En el mono, los núcleos ventrales presentan una inervación dopaminérgica heterogénea, existiendo áreas con marcada inervación, como el VLc, frente a otras con menos, como las subdivisiones correspondientes a los núcleos de relevo de información sensitiva (VPM y VPLc). En los núcleos ventrales del tálamo motor, el VLc tiene la mayor densidad de inervación dopaminérgica, seguida del VLo y VPLo. El VLps tiene una densidad moderada de inmunorreactividad para DAT. Por su parte, el núcleo VApc muestra una densidad más baja, mientras que el VAmc es el que tiene menor inervación dopaminérgica (García-Cabezas *et al.* 2007, 2009) (Figura 12A).

En el tálamo de humano, los núcleos ventrales presentan un patrón diferente en la distribución de los axones inmunorreactivos para DAT. La mayor densidad de inervación dopaminérgica se encuentra en el núcleo VA, incluyendo la parte VAmc, y en VL (VL a y VLp) (García-Cabezas *et al.* 2007) (Figura 12B).

El origen de la inervación dopaminérgica de los núcleos ventrales no es conocido completamente. La inervación dopaminérgica del núcleo VA proviene principalmente del LPbN, así como de A10; y en menor medida de A11 y A13 (Sánchez-González *et al.* 2005) (Figura 13).

2.4.3. Función

La convergencia en el estriado dorsal de las proyecciones talamoestriatales y corticoestriatales apoya el papel modulador de las proyecciones desde VA/VLo sobre los inputs desde corteza motora al estriado dorsal (McFarland and Haber 2000). Así mismo, los núcleos VA y VL tienen destacadas conexiones recíprocas tálamo-córtico-talámicas pero también reciben proyecciones no recíprocas. Estas proyecciones no

recíprocas suponen vías de retroalimentación para transmitir la información desde áreas prefrontales y áreas motoras anteriores a áreas motoras más caudales, influyendo sobre el funcionamiento motor (McFarland and Haber 2002). Todo ello sugiere una relevante influencia de los núcleos VA y VL en la función motora y en el comportamiento motor complejo (Matelli and Luppino 1996).

2.5. NÚCLEO RETICULAR

El núcleo R es una fina estructura que cubre el tálamo dorsal a lo largo de todo el eje cráneo-caudal del mismo. Está bordeado lateralmente por la cápsula interna, medialmente por la lámina medular externa, ventromedialmente por la zona incerta y posteriormente por el núcleo geniculado lateral. El núcleo R está compuesto en su totalidad por neuronas gabaérgicas inhibitorias, que son en su mayoría parvalbúmina+ (Zikopoulos and Barbas 2006) .

2.5.1. Conexiones

Las proyecciones corticotálámicas y talamocorticales dejan colaterales en el núcleo R, pero este no proyecta a corteza cerebral; mientras que sí tiene conexiones recíprocas con el resto del tálamo (Jones 1975; Guillery and Harting 2003). De esta manera, el núcleo R recibe aferencias excitatorias desde la corteza y tálamo, pero envía proyecciones inhibitorias solo al tálamo. Las terminales corticotálámicas constituyen las principales aferencias de las neuronas del núcleo R, formando más del 60% de las terminaciones sobre estas células. Por su parte, las terminaciones de las proyecciones talamocorticales suponen cerca de un 30% de las aferencias que reciben las neuronas del núcleo R. El resto de aferencias lo conforman las proyecciones desde sistemas moduladores subcorticales (Liu and Jones 1999).

Más específicamente, el núcleo R recibe proyecciones no recíprocas desde la corteza cerebral y estructuras subcorticales, y está conectado recíprocamente con todos los núcleos del tálamo dorsal. Cada región del núcleo R está conectada con un núcleo del tálamo dorsal y con su correspondiente territorio conectivo cortical. Así, áreas corticales y su núcleo talámico asociado comparten un mismo sitio de proyección en el núcleo R (Figura 19). Esta organización topográfica permite diferenciar distintos

sectores conectivos y funcionales a lo largo del eje antero-posterior. Se han descrito un sector prefrontal, un sector somatosensorial, un sector visual y un sector auditivo (Zikopoulos and Barbas 2007).

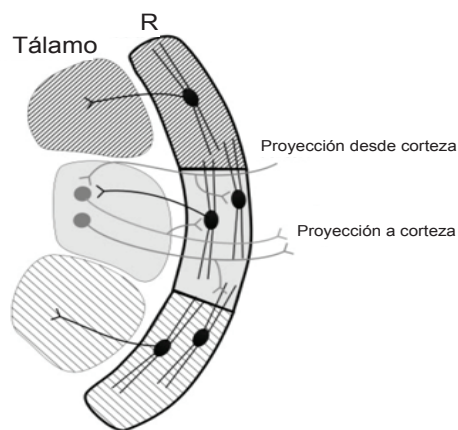


Figura 19. Esquema representativo de las conexiones del núcleo reticular. Se muestra el núcleo reticular (R) dividido en distintos sectores. Cada sector está conectado con un núcleo talámico o grupo de núcleos talámicos, y con su área cortical correspondiente. La disposición de las principales conexiones entre el tálamo, la corteza y el núcleo reticular se representa en el sector central. Se indican en negro las conexiones inhibitorias, y en gris las conexiones excitatorias. Modificado de Guillery and Harting 2003.

Así mismo, el núcleo R también recibe proyecciones directas desde los ganglios basales, concretamente desde el GPe. Estas proyecciones se sitúan en toda la extensión rostrocaudal y son colaterales de las principales fibras palidofugales; con origen en el principal fascículo del GPe que proyecta al GPi o STN (Cicirata *et al.* 1990; Hazrati and Parent 1991).

2.5.2. Inervación dopaminérgica

En el tálamo de primates, el núcleo R recibe inervación dopaminérgica moderada superior a la que se encuentra en roedores (García-Cabezas *et al.* 2007, 2009).

La inervación dopaminérgica del núcleo R del mono, tanto de axones inmunorreactivos para dopamina como para DAT, se localiza fundamentalmente a nivel del polo rostral, porción-dorsal. Este patrón es semejante en el tálamo humano (Sánchez-González *et al.* 2005; García-Cabezas *et al.* 2007) (Figura 12A-B).

2.5.3. Función

El núcleo R recibe proyecciones talamocorticales y corticotálamicas modulando el flujo de información hacia la corteza cerebral a través del tálamo (Jones 1975, 2007).

Mediante mecanismos de inhibición-desinhibición, el núcleo R determinaría en qué medida la información que se releva a través del tálamo lo hace sin cambios o con modificaciones. Más concretamente, el núcleo R está implicado en la regulación de las fases del ciclo vigilia-sueño (Steriade *et al.* 1986; Crunelli *et al.* 2018) y en procesos atencionales (McAlonan *et al.* 2006).

3. TÁLAMO Y PARKINSONISMO

En cerebros de pacientes con EP y en animales experimentales tratados con MPTP se han descrito modificaciones en el tálamo, incluyendo cambios bioquímicos, estructurales y funcionales que se revisan a continuación.

3.1. BIOQUÍMICA DEL TÁLAMO EN LA EP Y EN EL MODELO EXPERIMENTAL MPTP

No existen estudios detallados de la distribución de neurotransmisores en el tálamo de pacientes con EP o en modelos experimentales en primates no humanos. El conocimiento disponible proviene de estudios parciales de la concentración bioquímica.

3.1.1. Dopamina

Desde el punto de vista bioquímico, la concentración de dopamina en el tálamo de primates no humanos es menor que en otras estructuras cerebrales, como en los núcleos caudado y putamen o la sustancia negra (SN), e inferior respecto a la concentración de otros neurotransmisores (Piffl *et al.* 1991; Oke *et al.* 1997). Existen pocos estudios que hayan explorado la concentración de dopamina en el tálamo de sujetos con EP o en el modelo experimental de MPTP en monos.

La distribución de la concentración de dopamina en el tálamo de humanos se ha descrito parcialmente. Así se ha estudiado la concentración de dopamina en los núcleos VA, VL, CM y MD del tálamo de pacientes con EP y sujetos controles (Gerlach *et al.* 1996). En este análisis mediante cromatografía líquida con detección electroquímica mostró concentraciones muy inferiores de dopamina en sujetos controles respecto a otras estructuras, como el putamen o la SN. No se encontró variación significativa en la

concentración de dopamina entre pacientes con EP y sujetos controles (Gerlach *et al.* 1996).

En monos parkinsonizados con MPTP se describió una disminución significativa de la concentración de dopamina en los núcleos MD y CnMd-Pf del tálamo (41% respecto a la concentración en animales controles). Esta disminución de dopamina aparecía de forma temprana, en animales asintomáticos desde el punto de vista motor, en los que la concentración de dopamina en la SNc era del 31% respecto a animales controles (Piffl *et al.* 1990, 1991). Sin embargo, estudios posteriores, utilizando la misma metodología, no han reproducido tales resultados (Piffl *et al.* 2013) (Figura 20A–A’).

Se carece de estudios estructurales sobre el grado de afectación o de indemnidad de los axones dopaminérgicos, que permitan comprender la implicación del sistema dopaminérgico talámico en la fisiopatología de la enfermedad.

3.1.2. Noradrenalina

En pacientes con EP existe pérdida de neuronas noradrenérgicas en el *locus coeruleus* (Chan-Palay and Asan 1989); dicha pérdida es comparable incluso a la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la SNc (Zarow *et al.* 2003).

Mediante métodos bioquímicos, Piffl *et al.* mostraron depleción de noradrenalina en el tálamo de cerebros de pacientes con EP. Esta disminución de la concentración de noradrenalina se localiza en núcleos del tálamo motor (VA y VL), y también en los núcleos MD y CM (Piffl *et al.* 2012). Hallazgos similares se han encontrado en el tálamo de monos parkinsonizados con MPTP. Los animales parkinsonizados, que mostraban alteraciones motoras, tenían una disminución significativa de la concentración de noradrenalina en los núcleos ventrales del tálamo motor: VL y VA (Piffl *et al.* 2013). Este descenso no ocurría en estadios iniciales, teniendo los animales asintomáticos niveles de noradrenalina similares a los animales controles (Figura 20B–B’).

3.1.3. Serotonina

El sistema serotoninérgico presenta cambios en el cerebro de pacientes con EP,

donde se ha descrito pérdida neuronal en núcleos del raphe (Halliday *et al.* 1990) y depleción serotoninérgica en estructuras como el caudado, putamen, globo pálido e hipotálamo, así como en la corteza cerebral (Scatton *et al.* 1983; Birkmayer and Birkmayer 1987; Kish 2003). El sistema serotoninérgico del tálamo de pacientes con EP no ha sido estudiado. No obstante, en estudios de neuroimagen, se ha sugerido la existencia de una alteración en la utilización de la serotonina a nivel del tálamo (Caretti *et al.* 2008).

En el tálamo de monos parkinsonizados con MPTP, la innervación serotoninérgica parece no estar muy afectada: hay disminución de la concentración de serotonina en los núcleos VPL y CM predominantemente, sin existir cambios significativos en los núcleos ventrales del tálamo motor (VA, VL) ni en los núcleos MD y R (Pifl *et al.* 1990, 1991, 2013) (Figura 20 C-C').

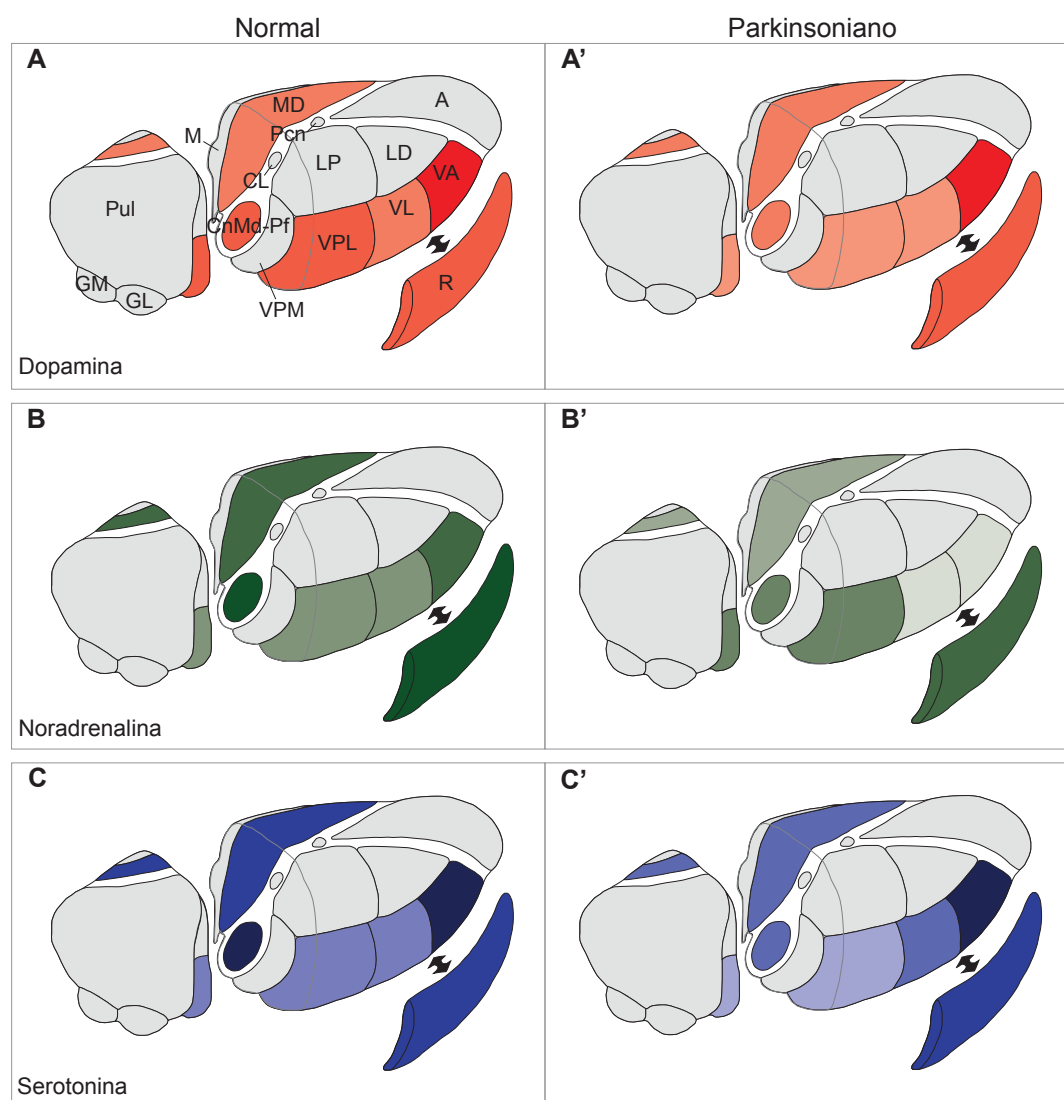


Figura 20. Ilustración esquemática de la distribución de la concentración de dopamina, noradrenalina y serotonina en el tálamo de monos. Se representa en condiciones normales (columna izquierda) y en monos parkinsonizados con MPTP (columna derecha). La intensidad de los colores representa la concentración media en cada núcleo talámico. Los núcleos no estudiados se representan en color gris. Abreviaturas: A, grupo anterior; CL, núcleo central lateral; CnMd-Pf, complejo nuclear centro mediano-parafascicular; GL, núcleo geniculado lateral; GM, núcleo geniculado medial; M, núcleos de la línea media; MD, núcleo dorsomediano; LD, núcleo lateral dorsal; LP, núcleo lateral posterior; Pcn, núcleo paracentral; Pul, núcleo pulvinar; R, núcleo reticular; VA, núcleo ventral anterior; VL, núcleo ventral lateral; VPL, núcleo ventral posterior lateral; VPM, núcleo ventral posterior medial. Basado en datos publicados en Pifl *et al.* 2013.

3.1.4. Acetilcolina

Al igual que en los mencionados sistemas moduladores, también existen modificaciones en el sistema acetilcolinérgico en cerebros de pacientes con EP. A nivel del núcleo pedunculopontino y del núcleo basal de Meynert existe una pérdida neuronal en cerebros de pacientes con EP respecto a controles sanos (Hazrati and Parent 1991; Zarow *et al.* 2003; Bohnen and Albin 2011).

Mediante estudios bioquímicos y de neuroimagen, se ha demostrado alteración de la acetilcolina en el tálamo de pacientes con EP. Xuereb *et al* estudiaron la distribución de la actividad de la acetilcolinesterasa y de la colina acetiltransferasa, así como la localización de los receptores nicotínicos en el tálamo de pacientes con EP y sujetos sanos. En sujetos controles la mayor actividad se localizaba en el grupo anterior del tálamo y el núcleo MD. En pacientes con EP existía una disminución de la actividad acetilcolinesterasa en el núcleo MD y en el núcleo VPL (Xuereb *et al.* 1990). Por su parte, estudios de neuroimagen con tomografía de emisión de positrones (PET) muestran una gran denervación colinérgica del tálamo de pacientes con EP comparado con sujetos controles (Bohnen *et al.* 2009).

No existen datos sobre la afectación del sistema acetilcolinérgico en el modelo experimental de EP con MPTP.

3.2. PATOLOGÍA ESTRUCTURAL DEL TÁLAMO EN LA EP Y MODELO EXPERIMENTAL MPTP

Los cambios estructurales en la EP no se limitan únicamente a las neuronas dopaminérgicas de la SNc, existiendo afectación de múltiples estructuras. No existen estudios estructurales globales o de ultraestructura que analicen la afectación del tálamo en el modelo experimental con MPTP en primates y en el cerebro de humanos con EP. No obstante, se ha descrito la presencia de depósitos de alfa sinucleína y degeneración neuronal en núcleos talámicos, tanto en EP como en modelos de parkinsonismo experimental en monos. Se revisan a continuación los hallazgos publicados.

3.2.1. Depósito de alfa sinucleína

En la EP, los cuerpos de Lewy se encuentran depositados en múltiples regiones cerebrales (Hughes *et al.* 1993). La presencia de cuerpos de Lewy en el tálamo se ha descrito en detalle en un estudio *post mortem* de cerebros de pacientes con EP (Rüb *et al.* 2002). En este trabajo, los cuerpos de Lewy aparecen en el tálamo de todos los cerebros estudiados, mostrando un patrón muy heterogéneo. El depósito de cuerpos de Lewy es máximo en núcleos de la línea media (paraventricular, parafasciculoso, y reuniens), así como en los núcleos intralaminares rostrales (central lateral, central

medial, paracentral y subparafascicular). El núcleo Pf, el núcleo VA y la porción dorsomedial del MD presentan un depósito moderado de cuerpos de Lewy. El resto de núcleos mostraban un patrón de depósito muy bajo (Rüb *et al.* 2002). La cantidad de los depósitos no se relacionó con la edad o la gravedad de la EP (Rüb *et al.* 2002). Otros autores han encontrado que la cantidad de cuerpos de Lewy es mayor en pacientes con EP y trastornos del sueño (Kalaitzakis *et al.* 2013). En resumen, los cuerpos de Lewy predominan en los núcleos talámicos que componen el circuito límbico de los ganglios basales (Figura 21).

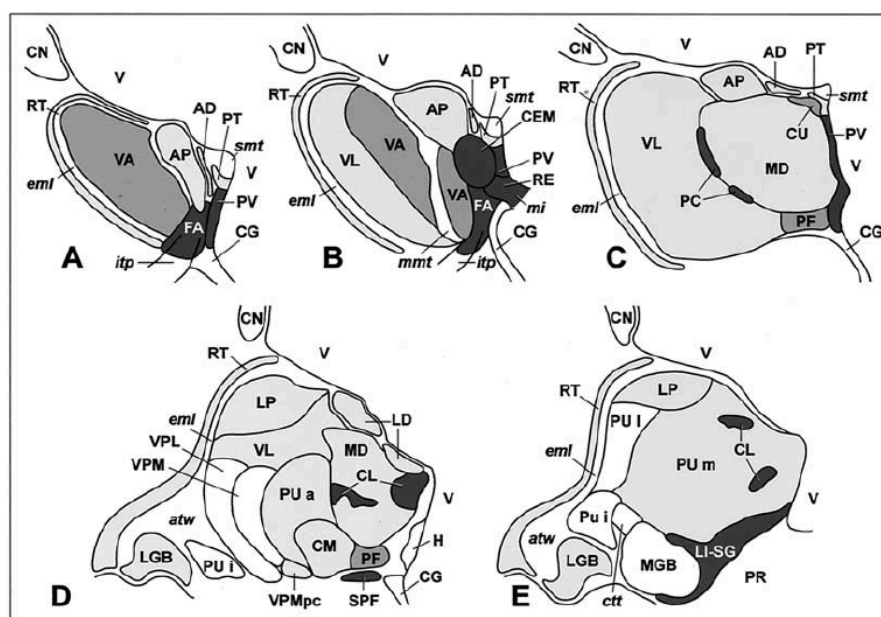


Figura 21. Representación esquemática del depósito de cuerpos de Lewy en los núcleos del tálamo humano. Se representan los distintos núcleos del tálamo sobre cortes coronales representativos del tálamo de humano, en sentido rostro-caudal (A-E). La intensidad del color refleja la cantidad de depósito de alfa sinucleína. Abreviaturas: AD, núcleo anterior dorsal; AP, núcleo anterior principal; atw, área triangular de Wernicke; CEM, núcleo central medial; CG, sustancia gris periacueductal; CL, núcleo central lateral; CM, núcleo centromediano; CN, núcleo caudado; CU, núcleo cucular; eml, lámina medular externa; FA, núcleo fasciculado; H, núcleo habenular; itp, pedúnculo talámico inferior; LD, núcleo lateral dorsal; LGB, núcleo geniculado lateral; LI-SG, complejo supragenicolado-limitans; LP, núcleo lateral posterior; MD, núcleo dorsomediano; MGB, núcleo geniculado medial; mi, masa intermedia; mmt, tracto mamilotalámico; PC, núcleo paracentral; PF, núcleo parafascicular; PR, pretectum; PT, núcleo paratenial; PUa, núcleo pulvinar anterior; PUl, núcleo pulvinar inferior; PUL, núcleo pulvinar lateral; PUm, núcleo pulvinar medial; PV, núcleo paraventricular; RE, núcleo reuniens; RT, núcleo reticular; smt, estria medular talámica; SPF, núcleo subparafascicular; V, ventrículo; VA, núcleo ventral anterior; VL, núcleo ventral lateral; VPL, núcleo ventral posterior lateral; VPM, núcleo ventral posterior medial; VPMpc, núcleo ventral posterior medial porción parvocelular. Tomado de Rüb *et al.* 2002.

3.2.2. Degeneración neuronal

La afectación patológica en la EP se extiende no solo a neuronas de sistemas

monoaminérgicos y colinérgicos, como se ha revisado previamente, sino también a grupos celulares. En el tálamo de cerebros de pacientes con EP existe pérdida de neuronas (Henderson *et al.* 2000a, 2000b; Halliday *et al.* 2005; Brooks and Halliday 2009; Truong *et al.* 2009). Esta degeneración neuronal afecta de forma casi específica al complejo CnMd-Pf, con una menor afectación de otros núcleos talámicos (Halliday 2009).

La degeneración neuronal en el CM es del 40-55% respecto a sujetos sanos, afectando selectivamente a neuronas no parvalbúmina positivas (Henderson *et al.* 2000a). En el núcleo Pf, la pérdida neuronal es del 30-50% afectando principalmente a células parvalbúmina positivas (Henderson *et al.* 2000a). La degeneración neuronal no se correlaciona con la edad, duración de la enfermedad o gravedad de la misma (Henderson *et al.* 2000a). Otros núcleos intralaminares, como el central lateral, cicular o paratenial, presentan también disminución en el número de neuronas (entre 30-50% de pérdida) (Brooks and Halliday 2009). En los núcleos VA, VL y AD no se encontraron diferencias entre pacientes con EP y controles sanos (Halliday *et al.* 2005).

En modelos de parkinsonismo en primates no humanos también se ha descrito la existencia de degeneración neuronal en el tálamo, siguiendo un patrón semejante al observado en humanos con EP. En el complejo CnMd-Pf la pérdida neuronal es del 49-52% en animales asintomáticos y del 60-62% en animales parkinsonizados, respecto a animales controles (Villalba *et al.* 2014). La presencia de pérdida neuronal en animales asintomáticos, sugiere que la degeneración ocurre de forma precoz, en paralelo con el proceso degenerativo en la SNc, siendo estable durante la duración de la enfermedad. En el núcleo MD se encontró pérdida celular de menor cuantía (18%) en animales con síntomas motores (Villalba *et al.* 2014).

La localización de estos cambios estructurales en núcleos relacionados con redes implicadas en funciones cognitivas y control motor, así como la precocidad en el curso de la enfermedad de tales cambios, sugieren su implicación en la aparición y desarrollo de la sintomatología motora y no motora de los pacientes con EP.

3.3. FISIOPATOLOGÍA DEL TÁLAMO EN LA EP

La implicación del tálamo en el desarrollo de síntomas motores o no motores en la EP no es bien conocida. Estudios de registro electrofisiológico y con lesión del núcleo ventral intermedio (VIM, VLp en macacos) en humanos han señalado una relación entre la actividad del circuito cerebelo-tálamo-cortical y la de los ganglios basales en la fisiopatología del temblor parkinsoniano. Así, se descubrieron las llamadas “neuronas tremóricas” en el núcleo VIM. Estas neuronas tienen una actividad oscilatoria sincrónica a la frecuencia del temblor de reposo en pacientes con EP (Ohye *et al.* 1974; Lenz *et al.* 1988). Además, es bien conocido que la lesión y la estimulación cerebral profunda de dicho núcleo, mejoran el temblor parkinsoniano (Benabid *et al.* 1987; Koller *et al.* 2000). La relación entre la actividad del VIM y la génesis del temblor parkinsoniano es apoyada también por estudios de magnetoencefalografía, resonancia magnética funcional y PET (Fukuda *et al.* 2004; Dirkx *et al.* 2016, 2017, 2019).

Precisamente, estudios recientes usando resonancia magnética funcional y modelos causales dinámicos han puesto de manifiesto la importancia del rol del sistema dopaminérgico en el funcionamiento de la red cerebelo-tálamo-cortical. Así, la alteración de las proyecciones dopaminérgicas en el núcleo VIM modificaría el circuito cerebelo-tálamo-cortical, siendo un elemento clave en la génesis del temblor parkinsoniano (Dirkx *et al.* 2017, 2019).

II. PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc, con la consiguiente depleción de dopamina estriatal, es el marcador neuropatológico de la EP (Ehringer and Hornykiewicz 1960).

Los síntomas motores de la enfermedad comienzan cuando la depleción de neuronas dopaminérgicas de la SNc es del 50-60%, y la reducción de terminaciones dopaminérgicas estriatales es del 70-80% (Fearnley and Lees 1990; Agid 1991). Síntomas no motores, como la anosmia, el estreñimiento, los déficits de atención y de función ejecutiva o los trastornos del sueño REM, están presentes antes de la aparición de los síntomas motores, progresando a medida que avanza la enfermedad (Postuma *et al.* 2012).

El tálamo de primates, humanos y no humanos, presenta una abundante innervación dopaminérgica (Sánchez-González *et al.* 2005; García-Cabezas *et al.* 2007), a diferencia del tálamo de roedores, que apenas está innervado por dopamina (Groenewegen 1988; Papadopoulos and Parnavelas 1990; García-Cabezas *et al.* 2009).

El origen de la innervación dopaminérgica del tálamo es muy diverso (Sánchez-González *et al.* 2005). Así mismo, la distribución de la innervación dopaminérgica en el tálamo de primates es muy compleja y heterogénea; existiendo núcleos densamente innervados, como algunos asociativos y los del tálamo motor, y otros débilmente innervados, como los de relevo sensorial (García-Cabezas *et al.* 2007, 2009). Los axones dopaminérgicos de los núcleos asociativos y motores del tálamo de primates expresan el transportador de dopamina (DAT), al igual que los axones del sistema mesoestriatal (Sánchez-González *et al.* 2005; García-Cabezas *et al.* 2007).

La hipótesis central de este proyecto de tesis doctoral es que, considerando el importante papel del tálamo en el circuito de los ganglios basales y la heterogénea y compleja innervación dopaminérgica del tálamo de primates, que incluye una gran población de axones que expresan DAT, el sistema dopaminérgico talámico está afecto en la EP y en el parkinsonismo experimental.

En base a ello, nos planteamos las siguientes hipótesis específicas:

- El sistema dopaminérgico talámico se encuentra afecto en el modelo experimental de EP por intoxicación con MPTP en primates no humanos.
- La afectación del sistema dopaminérgico talámico es variable en los diversos estadios de la enfermedad.
- La afectación del sistema dopaminérgico talámico es heterogénea, en consonancia con la heterogeneidad de la innervación dopaminérgica talámica.

Para examinar estas hipótesis, desarrollamos los siguientes objetivos:

- Mapear y describir la distribución de los axones inmunorreactivos frente al transportador de dopamina (DAT+) en los núcleos del tálamo de macacos parkinsonizados, del género *Macaca*.
- Estudiar cuantitativamente la innervación dopaminérgica del tálamo en un modelo crónico de EP por intoxicación con MPTP en macacos. Se estimarán, por métodos estereológicos, la longitud total y la densidad de axones DAT+.

Para ello se realizará:

- Estimación de la longitud y densidad de axones DAT+ en el núcleo más conectado con la corteza asociativa frontal, el dorsomediano (MD).
- Estimación de la longitud y la densidad de axones DAT+ en núcleos del circuito motor de los ganglios basales, como son el complejo nuclear centromediano-parafascicular (CnMd-Pf) y los núcleos ventral anterior (VA) y ventral lateral (VL).
- Estimación de la longitud y la densidad de axones DAT+ en el núcleo reticular (R), por ser un núcleo de características únicas en cuanto a conectividad con el tálamo y con corteza.

Este trabajo de investigación se encuadra en un proyecto amplio dirigido a investigar los cambios funcionales que ocurren en los ganglios basales en un modelo de parkinsonismo por MPTP lentamente progresivo.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo de un modelo lentamente progresivo de EP mediante intoxicación con MPTP fue realizado en la tesis doctoral “Déficit dopaminérgico y mecanismos compensatorios en la enfermedad de Parkinson: caracterización de un modelo progresivo en el mono tratado con MPTP”, por el doctor Javier Blesa (Universidad de Navarra, publicaciones derivadas: Blesa *et al.* 2010, 2012). El tejido utilizado en este proyecto de tesis procede de los monos utilizados para análisis histológicos de la tesis doctoral del doctor Blesa. Los experimentos y análisis descritos en los apartados de 2.3-2.7 han sido realizados específicamente para este trabajo de tesis doctoral.

1. ANIMALES

Se utilizaron 21 monos macacos (*Macaca fascicularis*) de ambos sexos (20 machos y 1 hembra). La edad al inicio del estudio varió entre 4 y 11 años y el peso entre 2,5 y 7 kg (Tabla 1). Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las guías europeas y españolas para la manipulación de animales de experimentación (86/609/EEC and 2003/65/EC European Council Directives; and R.D. 1201/2005 and Ley 32/2007). Los experimentos fueron aprobados por los correspondientes Comités de Ética en Investigación de las Universidades de Navarra y Autónoma de Madrid.

2. MÉTODOS

2.1. INTOXICACIÓN POR MPTP Y VALORACIÓN MOTORA

Diecisiete monos fueron sometidos a un protocolo de intoxicación progresiva con dosis bajas de MPTP con el objetivo de producir una degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas (Tabla 1: M5-M21). Se utilizaron además 4 monos como controles (Tabla 1: M1-M4).

En todos los monos experimentales la dosis inicial de MPTP fue de 0,5 mg/kg administrada por vía intravenosa. Las inyecciones se repitieron cada 15 días aproximadamente, de acuerdo con la respuesta de cada individuo. El número total de dosis varió entre 1-15, y la dosis total acumulativa entre 2 y 22,67 mg/kg (Tabla 1). En los monos del grupo control se realizó un procedimiento análogo, inyectando dosis de suero salino estéril.

Tabla 1 . Características de los monos del grupo control y grupos experimentales

Animal	Grupo	Sexo	Edad (años)	Peso (kg)	Número de dosis	Dosis total de MPTP (mg/kg)	Escala motora máxima	Escala motora estable
M1	Control	Macho	6,4	3,5	0	0	0	0
M2	Control	Macho	3,6	2,3	0	0	0	0
M3	Control	Macho	6,3	7,4	0	0	0	0
M4	Control	Macho	6,0	6,2	0	0	0	0
M5	Asintomático	Macho	4,3	3,3	2	2,92	0	0
M6	Asintomático	Macho	4,4	3,6	2	3,35	0	0
M7	Asintomático	Macho	3,8	3,8	2	3,35	0	0
M8	Asintomático	Macho	4,5	3,8	2	2,7	0	0
M9	Recuperado	Macho	5	7,4	2	5,86	2	0
M10	Recuperado	Macho	6,1	5,3	5	12,67	5	0
M11	Recuperado	Macho	4,5	3,6	2	3,55	3	0
M12	Recuperado	Macho	4,5	4,0	1	2	9	0
M13	Moderado	Macho	6,5	5,0	4	7,95	23	10
M14	Moderado	Macho	3,9	2,5	5	6,6	15	11
M15	Moderado	Macho	4,1	3,7	2	3,55	28	9
M16	Moderado	Macho	4,2	3,0	5	5,97	13	10
M17	Grave	Hembra	11	3,5	15	20,87	25	20
M18	Grave	Macho	6,5	4	9	22,67	23	21
M19	Grave	Macho	4,5	3,3	5	9,6	20	22
M20	Grave	Macho	4,5	3,6	4	7,16	21	20
M21	Agudo	Macho	4	2,5	2	4	27	29

Se realizaron valoraciones semanales del estado motor de los animales, mediante la evaluación de síntomas parkinsonianos usando la escala motora de Kurlan (Kurlan *et al.* 1991). La escala de Kurlan varía de 0 a 29 puntos, siendo 0 la ausencia de signos motores anormales y 29 la presencia de signos motores parkinsonianos de gravedad máxima.

En función de la puntuación en la escala Kurlan, los animales intoxicados con MPTP fueron clasificados en los siguientes grupos (Tabla 1):

Grupo asintomático: animales tratados con dos inyecciones de MPTP y que nunca desarrollaron ningún signo motor parkinsoniano.

Grupo recuperado: animales tratados con una o más inyecciones de MPTP y que desarrollaron signos motores parkinsonianos con posterior recuperación a su estado basal, de manera que en el momento del sacrificio no mostraban ningún signo motor parkinsoniano.

Grupo parkinsoniano moderado: animales tratados con MPTP que en el momento de su sacrificio tenían signos moderados y estables de parkinsonismo (escala de Kurlan < 18 puntos).

Grupo parkinsoniano grave: animales tratados con MPTP que en el momento de su sacrificio presentaban marcados signos motores, con postura en flexión de tronco, marcada disminución de la movilidad espontánea y rigidez generalizada (escala de Kurlan ≥ 18 puntos).

Uno de los animales presentó una reacción aguda ante la segunda dosis de MPTP, con deterioro rápido de las funciones vitales, que obligó a su sacrificio. Este animal se consideró como **parkinsoniano agudo** (Tabla 1: M21). Los Resultados relativos a este animal se tratan en capítulos específicos de esta Tesis. Cuando no se menciona específicamente, los Resultados y Discusión se refieren al resto de grupos experimentales.

2.2. OBTENCIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL

2.2.1. Perfusión

Tras haber sido previamente tranquilizados con una dosis intramuscular de ketamina (10mg/kg), los animales fueron anestesiados profundamente con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Doletal[®], 10mg/kg). Tras comprobar la abolición del reflejo corneal y otros reflejos defensivos, se practicó una toracotomía seguida de perfusión a través de la aorta ascendente con suero salino (NaCl al 9%), una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (*Phosphate Buffer*, PB) y soluciones de sacarosa (5%-10%-20%) en PB a 4°C (ver Anexo, Tampones y Soluciones).

La perfusión se inició administrando 0,5-1 litro de suero salino, seguido del paso, en 5-10 minutos, de 1 litro de volumen de la solución de paraformaldehído. Posteriormente, se completó la perfusión, hasta un total de 5-7 litros de volumen, de dicho fijador durante una hora. Finalmente, se perfundieron las soluciones de sacarosa (1,5 litros de cada una) siguiendo el orden de concentraciones ascendentes. Tras finalizar la perfusión, se decapitó al animal y se extirpó con una gubia la bóveda craneal hasta exponer el cerebro. Los hemisferios izquierdos fueron bloqueados estereotáxicamente en el plano coronal y utilizados en la tesis doctoral del doctor Blesa (Blesa *et al.* 2010, 2012).

Los hemisferios derechos fueron bloqueados estereotáxicamente en el plano sagital realizándose un corte paralelo a la línea media, a 1 cm del plano sagital medio. El estudio con cortes realizados en el plano parasagital es el adecuado para realizar el muestreo sistemático necesario para el conteo estereológico de núcleos del tálamo con forma tridimensional muy asimétrica, como es el núcleo R. Además, dicho plano resultó óptimo para muestrear y visualizar axones DAT+ orientados en el plano parasagital, como es el caso del núcleo MD (García-Cabezas *et al.* 2009) y de los axones DAT+ del polo rostral del núcleo R.

Los cerebros fueron extraídos y crioprotegidos a 4°C en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato hasta que se hundieron, para tener seguridad de que la crioprotección fuera homogénea. Normalmente, este proceso duraba unas 2-3 semanas. Posteriormente fueron almacenados a -20°C en una solución crioprotectora (ver Anexo, Soluciones) hasta ser cortados.

2.3. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

2.3.1. Corte de los bloques

Los bloques del hemisferio derecho se cortaron con un microtomo (Leica®, SM2400), que lleva acoplado un sistema de congelación del tejido (Leica®, Frigomobil) manteniendo la platina en torno a -30°C. Se realizaron cortes seriados parasagitales de 40 µm de grosor, recogiendo 10 series de unos 25-35 cortes cada una. Se seleccionaron tres series adyacentes, una para ser procesada para inmunohistoquímica frente a DAT, otra para histoquímica de acetilcolinesterasa (AChE), siguiendo protocolo previamente descrito (Cavada *et al.* 1995), y una serie adicional para tinción con violeta de cresilo, para revelar la citoarquitectura (ver Anexo, Protocolos 1 y 2). De esta forma, la serie de cortes utilizada para la inmunohistoquímica frente a DAT distaba 80 µm de la serie teñida con violeta de cresilo y 40 µm de la serie con histoquímica de AChE. La histoquímica de AChE revela la actividad de esta enzima, permitiendo el estudio de la quimioarquitectura, y con ello diferenciar distintas regiones anatómicas, en nuestro caso los núcleos talámicos, cuyos límites fueron trazados en base al patrón de AChE.

Los cortes de las series restantes se almacenaron a -20°C en solución crioprotectora (ver Anexo, Soluciones).

Como excepción, se usaron cortes coronales en un único animal (M17) ya que se había cortado entero en dicho plano en el experimento anterior (Blesa *et al.* 2010, 2012).

2.3.2. Inmunohistoquímica frente al transportador de dopamina

Se realizó inmunohistoquímica frente a DAT para estudiar la innervación dopaminérgica del tálamo de los distintos grupos de monos macacos. Se utilizó un protocolo basado en el descrito previamente (García-Cabezas *et al.* 2007), con modificaciones. Como anticuerpo primario se empleó el anticuerpo monoclonal anti DAT hecho en rata MAB 369 (Chemicon International) y como anticuerpo secundario, el anticuerpo biotinado conejo anti-rata BA-4000 (Vector Laboratories), con posterior revelado por el método DAB-níquel, con intensificación con glucosa oxidasa (Shu *et al.* 1988) (ver Anexo, Protocolo 3).

Tras el procesamiento para inmunohistoquímica en flotación, las secciones fueron montadas sobre portaobjetos gelatinizados (ver Anexo, Protocolo 4). Pasadas 24-48 horas tras el montaje, las secciones fueron deshidratadas en soluciones de concentración creciente de etanol y deslípificadas con xylol (ver Anexo, Protocolo 5). Posteriormente, se cubrieron con cubreobjetos utilizando DePeX[®] como medio adhesivo.

2.4. PARCELACIÓN DEL TÁLAMO

En fotografías de las series procesadas para AChE, se trazaron los bordes del tálamo y los bordes de los núcleos a estudiar. Para esta parcelación se utilizaron la terminología y criterios de Olszewski (Olszewski, 1952), con modificaciones (Cavada *et al.* 1995). Los bordes del tálamo y de los diversos núcleos trazados sobre las imágenes de AChE fueron trasladados a las imágenes de los cortes adyacentes procesados para DAT utilizando el software StereoInvestigator versión 8.0 (MicroBrightField Bioscience, Williston, USA). Para ello se tomaron como referencias los bordes de los cortes y vasos sanguíneos. Los dibujos se realizaron sobre la pantalla

de un ordenador, usando un objetivo de 4x en un microscopio Zeiss Axioskop (Oberkochen, Germany) equipado con una cámara digital (DV-20, MicroBrightField Europe) y una platina motorizada conectados al ordenador.

Inicialmente, se intentó trazar los límites entre VA y VL pero ante la imposibilidad de conseguir una delimitación consistente, se optó por estudiar los núcleos ventrales del tálamo en conjunto.

2.5. ELABORACIÓN DE MAPAS DE LA DISTRIBUCIÓN DE AXONES DAT+

Se realizaron mapas de la distribución de los axones DAT+ en dos cortes parasagitales representativos de un animal de cada grupo. El objetivo era obtener una representación cualitativa de la distribución y de las variaciones en la densidad de los axones DAT+ en los distintos grupos de monos macacos.

Sobre los cortes inmunoteñidos frente a DAT, se tomó un mosaico de fotos usando un objetivo de 20x en el microscopio descrito anteriormente, mediante el programa Neurolucida v9.0[®] (MicroBrightField, Colchester, VT, USA). Se aplicaron filtros *High pass* y *Kodalith* para aumentar el contraste de los axones DAT+ y transformar las regiones más oscuras en píxeles negros sobre fondo blanco (Figura 22A-B). Con ello, se obtuvo una representación monocromática de los axones inmunoteñidos (Figura 22C).

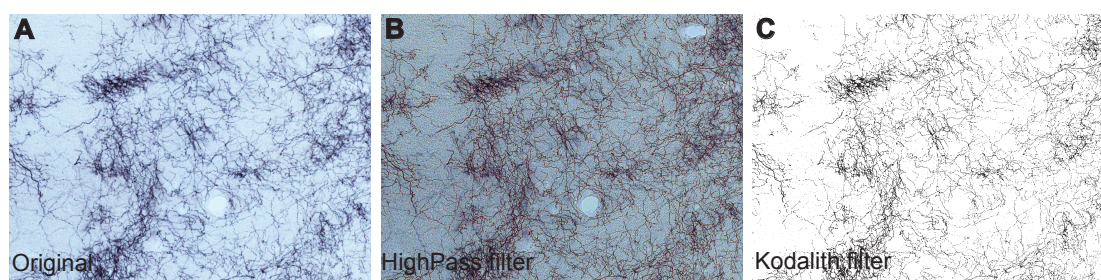


Figura 22. Procedimiento para la elaboración de los mapas de distribución de axones DAT+. Se muestra una de las imágenes de un mosaico original (A), los filtros aplicados (B y C).

La presentación de estos mapas en las figuras correspondientes, así como el resto de figuras de la tesis, se realizaron con el programa Adobe Illustrator CS5 y el programa RStudio.

2.6. ESTUDIO ESTEREOLÓGICO

Se cuantificó la longitud total y la densidad de longitud de los axones inmunorreactivos para DAT en los núcleos MD, CnMd-Pf, ventrales y R, mediante estereología.

El método estereológico utilizado permite estimar la longitud total de elementos lineales incluidos en una estructura biológica. La cuantificación de la longitud se basa en las intersecciones entre los elementos lineales y una sonda de muestreo de dimensiones conocidas, así como en las características de la estructura biológica en estudio. Mediante la sonda se realiza un muestreo aleatorio-sistemático de la estructura biológica de interés, en las distintas secciones de tejido en las que se encuentra.

Para la cuantificación de la longitud axónica se empleó el método de *SpaceBalls*, que utiliza una hemiesfera como sonda de muestreo (Figura 23). La hemiesfera tiene la ventaja de ser isotrópica por sí misma, no precisando de la orientación en distintos planos para su adecuado uso, como ocurre con otras sondas, como los planos virtuales.

La longitud de axones DAT+ se estimó en base al sumatorio de intersecciones de los axones DAT+ con la hemisfera, y a los datos relativos a la hemiesfera y al volumen muestreado, siguiendo para ello la fórmula descrita previamente (Mouton *et al.* 2002).

$$L = 2 \cdot \left(\sum_{i=1}^n Q_i \right) \cdot \frac{v}{a} \cdot F_1 \cdot F_2 \cdot F_3$$

Siendo:

- ***L***: la longitud total estimada de axones DAT+
- ***Q_i***: el número total de intersecciones entre la sonda de muestreo (hemiesfera) y la superficie lineal (los axones DAT+)
- ***v***: volumen del paralelepípedo en el que se incluye la sonda hemisférica
- ***a***: la superficie de la sonda hemisférica ($2\pi r^2 \mu\text{m}^2$)
- ***F₁*** = $1/ssf$

ssf (*section sampling fraction*): Fracción de muestreo de sección. Ratio entre el número de total de secciones estudiadas y el número total de secciones que contienen la región de interés.

- $F_2 = 1/ssf$

asf (*area sampling fraction*): Fracción de muestreo de área. Ratio entre el área del paralelepípedo en el que se incluye la sonda hemiesférica y el área asociada al disector, esta última determinada por la distancia entre los disectores.

- $F_3 = 1/tsf$

tsf (*thickness sampling fraction*): Fracción de muestreo del grosor. Ratio entre el radio de la sonda hemiesférica y el grosor del tejido tras el procesamiento.

La fórmula utilizada en el análisis de este trabajo, que es la utilizada por el programa Stereoinvestigator, es una modificación de la anterior:

$$L = 2 \cdot \left(\sum_{i=1}^n Q_i \right) \cdot \frac{v}{a} \cdot F_1$$

Siendo:

- L : la longitud total estimada de los axones DAT+
- Q_i : el número total de intersecciones entre los axones y la sonda
- v : el volumen obtenido multiplicando la distancia entre los disectores (horizontal y vertical) por el grosor medio de la sección
- a : la superficie de la esfera
- $F_1 = 1/ssf$

ssf (*section sampling fraction*): Fracción de muestreo de las secciones

Nótese que esta fórmula elimina las fracciones F_2 (fracción de muestreo del área) y F_3 (fracción de muestreo del grosor) usadas por Mouton *et al.* incluyendo la información de F_2 y F_3 en v .

Previo al estudio definitivo, se realizó un estudio piloto para determinar las características óptimas de la sonda y del muestreo. Para la sonda de muestreo se estableció una zona de guarda superior de 2 μm y un radio de la hemiesfera de 10 μm .

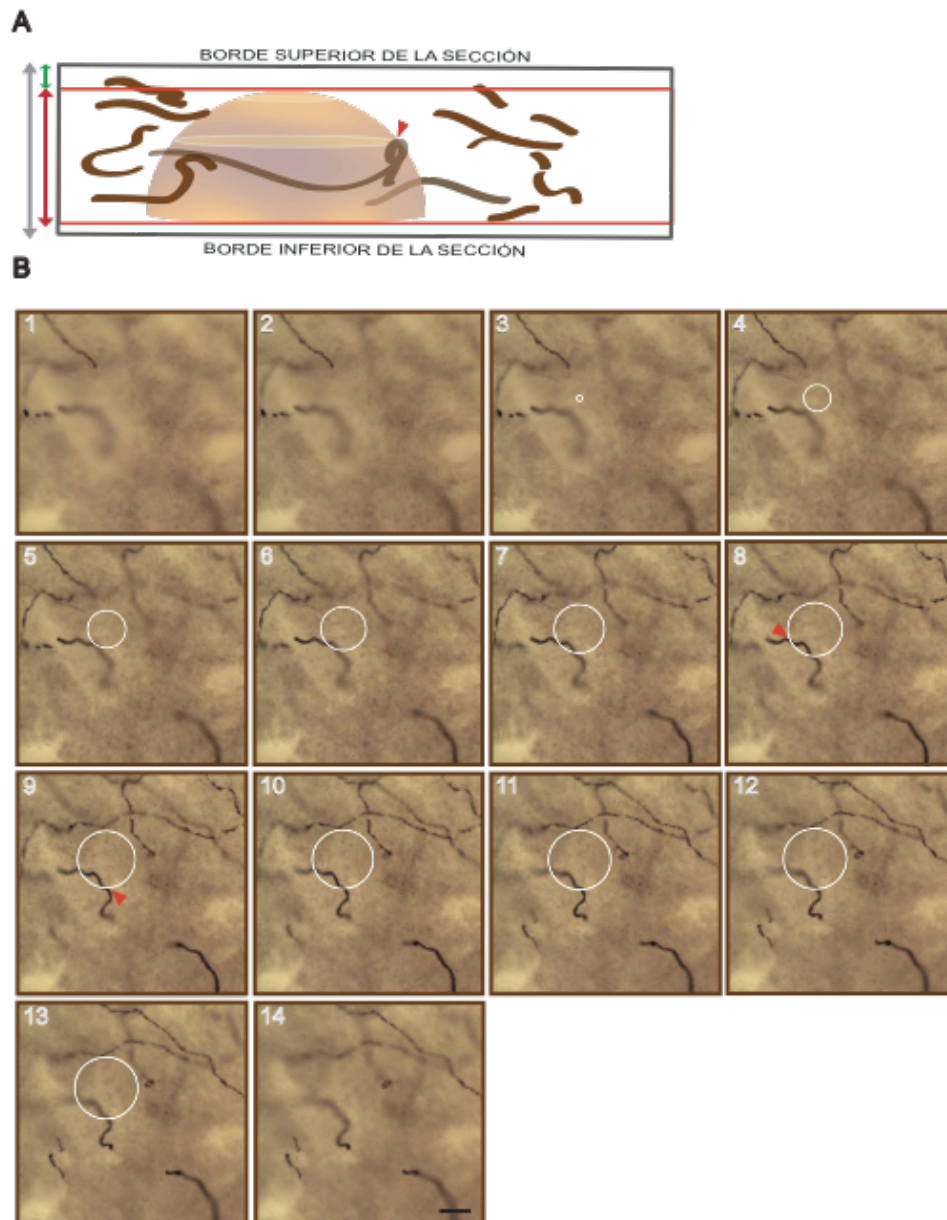


Figura 23. Método estereológico. (A) Representación de la hemiesfera utilizada como método de estimación de longitud. La flecha en gris representa la altura/grosor del corte, la flecha roja representa el radio de la hemiesfera y la flecha verde la zona de guarda superior. Los axones se representan en color marrón. (B) Microfotografías de un punto de muestreo. La distancia entre cada imagen es de 1 μm en el eje Z, comenzando por el borde superior (1) de la sección hasta el borde inferior (14). Los círculos blancos representan los perímetros consecutivos de las secciones de la hemiesfera. La flecha roja señala la intersección de un axón DAT+ con la hemiesfera. Barra de calibración: 10 μm .

Se determinó la distancia sistemática del marco de muestreo, siendo de 500 μm en las dimensiones, horizontal y vertical, para los núcleos MD y ventrales; y de 200 μm para los núcleos CnMd-Pf y R. El software dispone aleatoriamente las sondas sobre la región dibujada, y las distribuye de forma sistemática con dichas distancias en los ejes horizontal y vertical. Tras la cuantificación de la longitud de axones DAT+, se calculó

el coeficiente de error (CE) para cada núcleo de cada animal experimental aplicando la fórmula para la varianza (Gundersen and Jensen 1987), y ajustándolo en función de la morfología del área de referencia de cada núcleo (García-Fiñana and Cruz-Orive 2000).

Un investigador externo realizó la cuantificación en 2 animales, obteniéndose diferencias inter-investigadores inferiores al 10%. Así, nos aseguramos que las posibles diferencias en las estimaciones de longitud axónica obedecieran a variaciones reales, intrínsecas del animal y/o grupo, y no a variabilidad aportada por el investigador. Los investigadores permanecieron ciegos sobre el grupo experimental al que pertenecía cada animal a lo largo de todo el estudio.

Para estimar la densidad de longitud de axones DAT+ se dividió la longitud entre el volumen de cada núcleo talámico. La estimación de volumen de cada núcleo o grupo de núcleos talámicos se realizó mediante el Principio de Cavalieri (Gundersen and Jensen 1987):

$$\hat{V} = A_p \cdot t \cdot \left(\sum_{i=1}^n P_i \right)$$

Siendo:

- \hat{V} : el volumen estimado
- A_p : el área asociada con cada punto de la cuadrícula
- t : distancia entre secciones
- P_i : el número de puntos de la región de interés contados

Para cada núcleo talámico, la densidad de axones DAT+, definida como longitud total de axones DAT+ por unidad de volumen, se expresó en metros por milímetro cúbico (m/mm³).

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos fue realizado con el programa SPSS versión 22.0 (Software para Windows; SPSS Inc., Chicago. IL, USA) y RStudio.

Dado el tamaño muestral de los cuatro grupos experimentales, no se asumió normalidad. Todas las comparaciones fueron realizadas usando test de Kruskal-Wallis con análisis *post hoc* de U Mann-Whitney. Todas las variables analizadas son variables cuantitativas que se expresaron como media más menos desviación típica o como mediana y rango intercuartílico. Se realizó cálculo de correlaciones mediante el coeficiente de correlación de Spearman (rho de Spearman) con representación en matriz de correlaciones. En dicho análisis se incluyeron variables cuantitativas de los animales experimentales ya descritas [escala motora, densidad óptica DAT en el estriado y número de neuronas dopaminérgicas en los grupos A8, A9, A10 y A11 (Blesa *et al.*, 2012)]. En función del coeficiente, las correlaciones se interpretaron de la siguiente forma: muy baja (0,01-0,19), baja (0,2-0,39), moderada (0,4-0,69), alta (0,7-0,89) y muy alta (0,9-0,99). Se realizó regresión no lineal entre la densidad de longitud de axones DAT+ y aquellas variables cuantitativas que presentaban un nivel de correlación moderado o alto. En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula cuando el error alfa fue menor de 0,05 ($p < 0,05$).

Se excluyeron del análisis estadístico los datos del mono M2, por carecer del número suficiente de secciones de tejido para el estudio estereológico óptimo. Así mismo, se excluyó el dato de densidad de longitud de axones DAT+ del núcleo R del mono M17, porque el plano de corte no era óptimo para el estudio estereológico de ese núcleo, debido a la irregular distribución de la innervación dopaminérgica.

Los gráficos se realizaron con RStudio y se modificaron con Adobe Illustrator CS5. En los diagramas de cajas la línea central de las cajas representa la mediana. El límite alto y bajo de la caja representa el primer y tercer cuartil. Los extremos de las barras representan los valores mínimos y máximos. Los puntos representan los valores individuales de cada animal de cada grupo.

IV. RESULTADOS

1. DISTRIBUCIÓN DE LA INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA DEL TÁLAMO EN LOS MONOS MACACOS PARKINSONIZADOS

Se realizaron mapas de distribución de los axones DAT+ del tálamo en dos cortes representativos de un animal de cada grupo (Figuras 24-29).

En el grupo control la distribución de axones DAT+ seguía el patrón ya descrito previamente (García-Cabezas *et al.* 2009) (Figura 24). Las zonas con inervación más densa corresponden a porciones del núcleo MD, incluyendo MDm, MDv y MDl, al LP y a la región posterior del VLc. El núcleo MD presenta una inervación heterogénea, con una mayor inervación en la región medial, con un gradiente antero-posterior y ventro-dorsal. Esta región se corresponde con el MDm y territorios adyacentes del MDv y MDl. La región más posterior y más lateral del núcleo MD presenta una inervación más pobre. El complejo CnMd-Pf tiene una inervación marcadamente inferior a la del núcleo MD. La inervación se concentra en la región más medial y ventral del núcleo, correspondiente a la porción Pf. El conjunto de los núcleos ventrales presentaba una inervación heterogénea. Existe una marcada inervación en las regiones magnocelular y parvocelular del núcleo VA, así como en regiones del VL (sobre todo VLm, VLo) y en el VPLo. Además, destaca la marcada inervación del núcleo VPM. La inervación dopaminérgica de axones DAT+ del núcleo R se localiza predominantemente en la región más anterior del núcleo (Figura 24).

En los macacos tratados con MPTP se observaron cambios en la distribución de los axones DAT+ (Figuras 25-29), específico para los diversos núcleos talámicos estudiados y para regiones concretas dentro de ellos. Se describen a continuación estas observaciones para cada núcleo analizado.

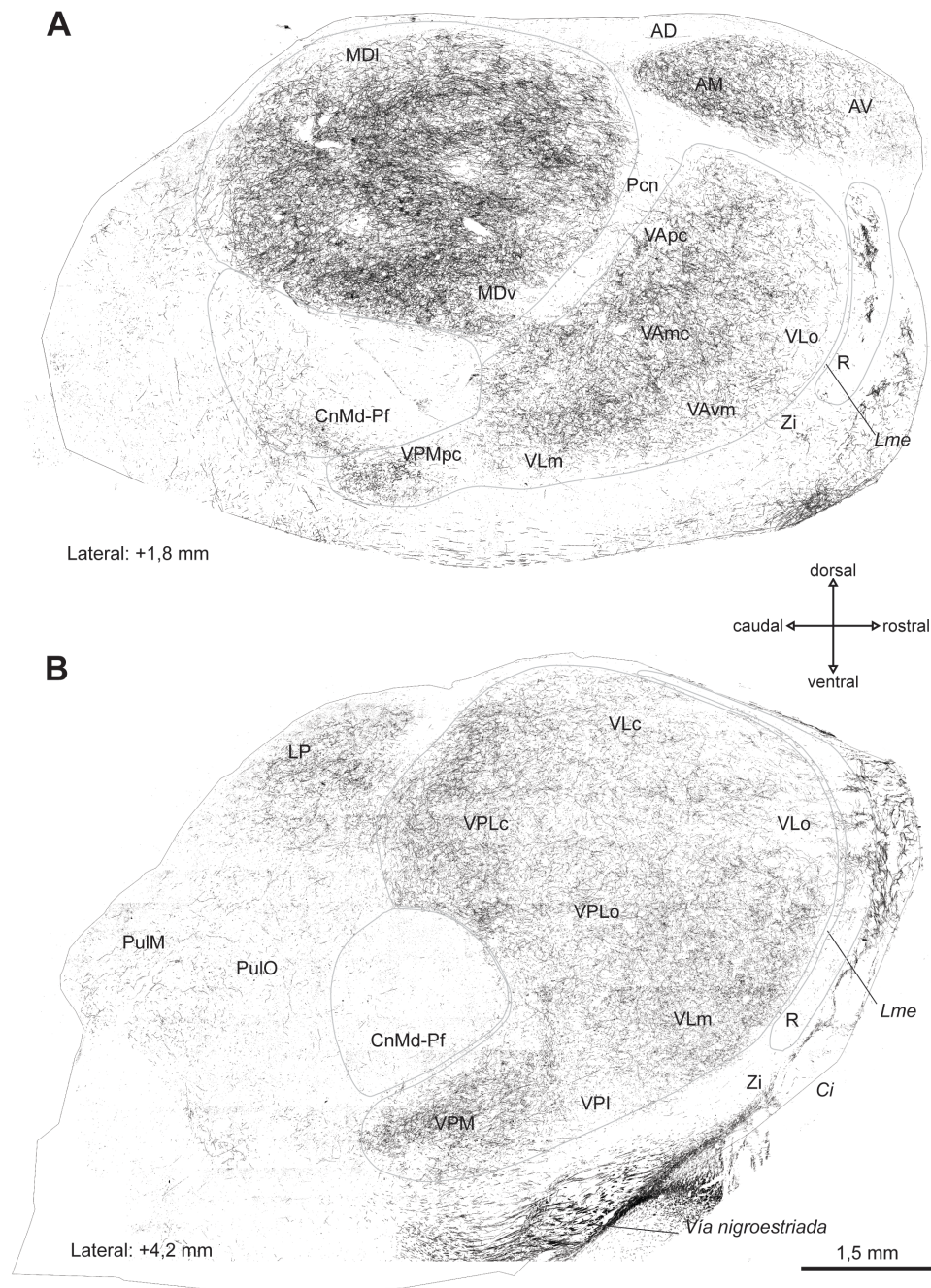


Figura 24. Distribución de axones inmunorreactivos para DAT en el tálamo de un macaco control. Se muestran dos cortes parasagitales representativos. La distancia estereotáxica respecto a la línea media se representa en el margen inferior izquierdo. La barra de calibración es común para los dos mapas. Nótese la heterogeneidad de la innervación dopaminérgica en los distintos núcleos talámicos. Ver lista de abreviaturas para identificar los núcleos talámicos.

1.1. DISTRIBUCIÓN DE LA INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA EN EL NÚCLEO DORSOMEDIANO

En los macacos tratados con MPTP se observó, respecto a los macacos control, una disminución precoz de axones DAT+ en el núcleo MD. Este descenso estaba presente en los macacos del grupo asintomático con una progresiva disminución en el resto de grupos (Figuras 25A, 26A, 27A y 28A). La menor inervación se observaba en los macacos del grupo parkinsoniano grave. La pérdida de axones DAT+ parece afectar de forma global al núcleo MD, si bien resulta llamativa la denervación en regiones dorsales del MD (Figura 30). Esta región dorsal del MD corresponde al sector MDI del núcleo. Esta depleción está presente en todos los grupos de macacos tratados con MPTP, siendo mayor en los macacos del grupo parkinsoniano grave (Figura 30). Los axones DAT+ en la región más ventral del núcleo MD, correspondiente al sector MDv y a la región ventral del MDI, se encuentran más conservados, también en el grupo parkinsoniano grave (Figura 30).

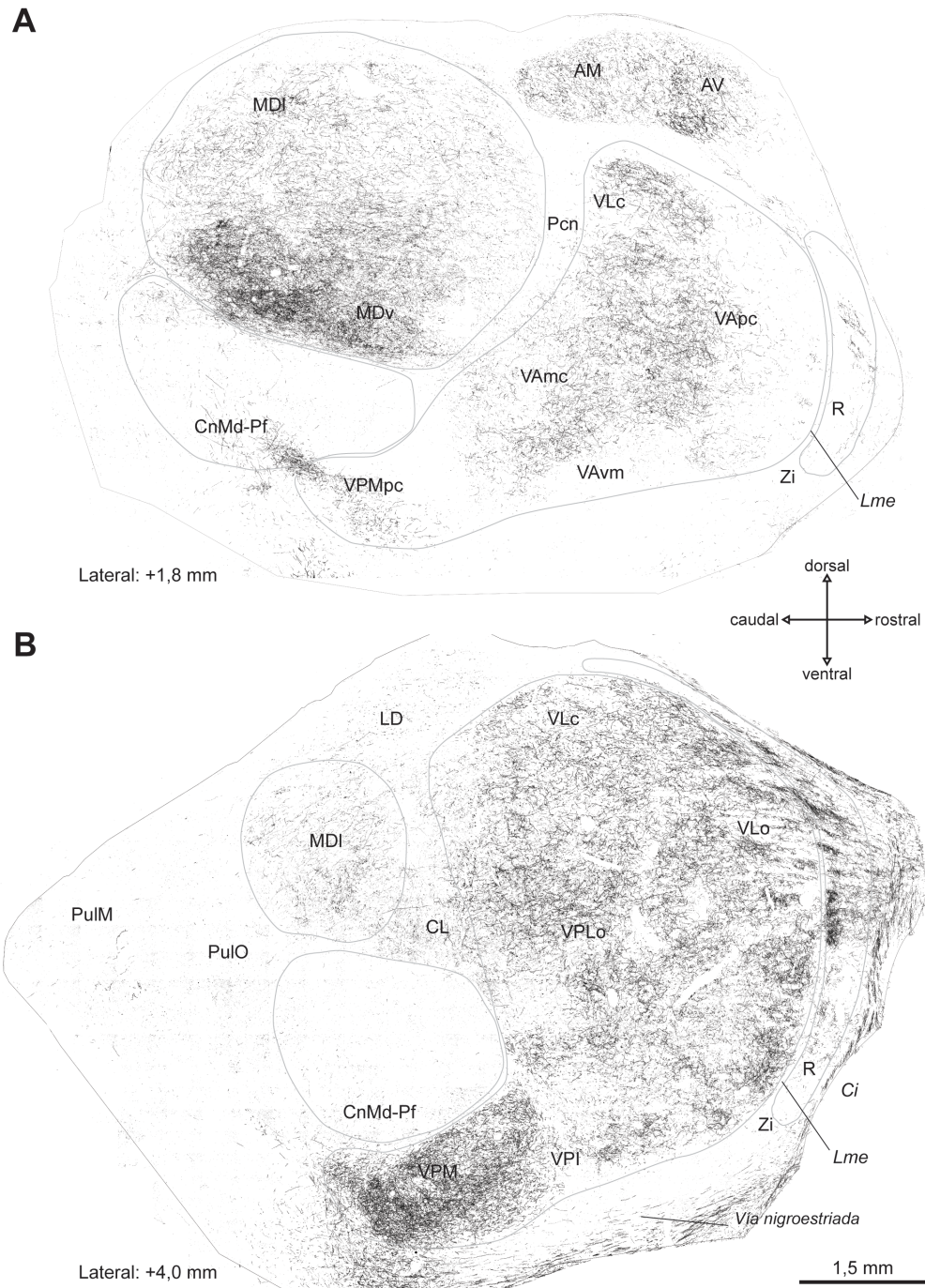


Figura 25. Distribución de axones inmunorreactivos para DAT en el tálamo de un macaco asintomático. Se muestran dos cortes parasagitales representativos. La distancia estereotóxica respecto a la línea media se representa en el margen inferior izquierdo. La barra de calibración es común para los dos mapas. Ver lista de abreviaturas para identificar los núcleos talámicos.

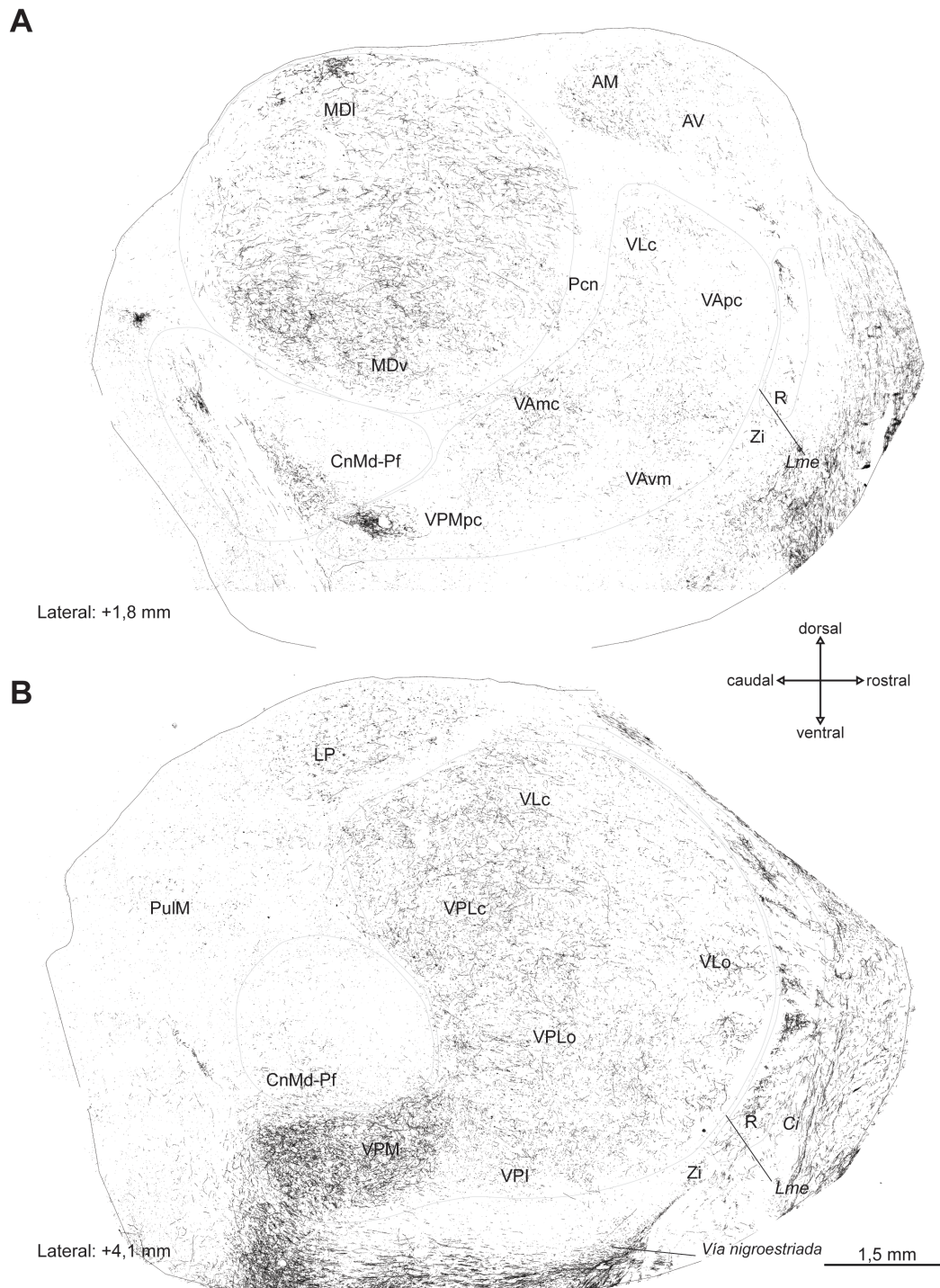


Figura 26. Distribución de axones inmunorreactivos para DAT en el tálamo de un macaco recuperado. Se muestran dos cortes parasagitales representativos. La distancia estereotóxica respecto a la línea media se representa en el margen inferior izquierdo. La barra de calibración es común para los dos mapas. Ver lista de abreviaturas para identificar los núcleos talámicos.

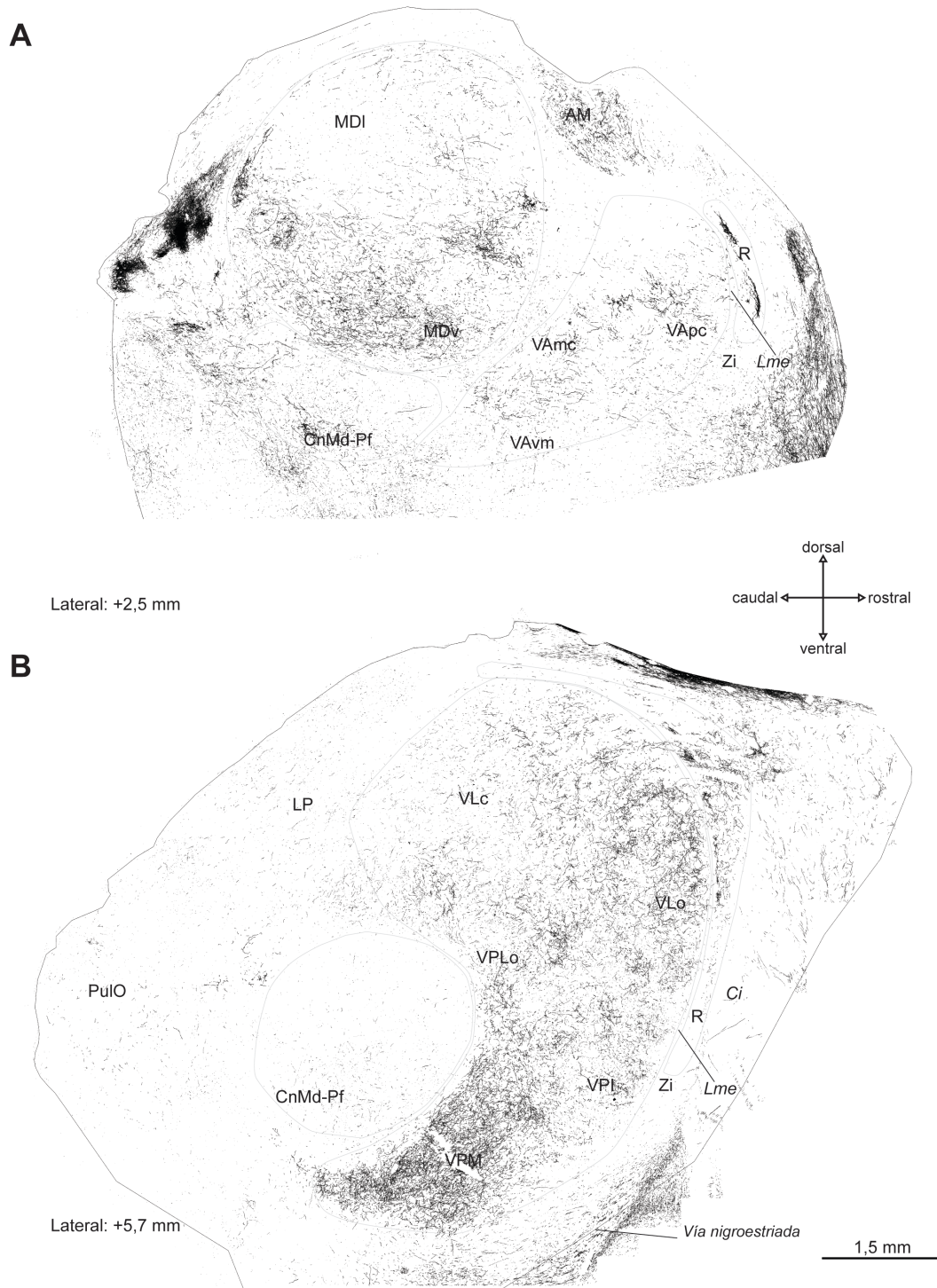


Figura 27. Distribución de axones inmunoractivos para DAT en el tálamo de un macaco parkinsoniano moderado. Se muestran dos cortes parasagitales representativos. La distancia estereotáxica respecto a la línea media se representa en el margen inferior izquierdo. La barra de calibración es común para los dos mapas. Ver lista de abreviaturas para identificar los núcleos talámicos.

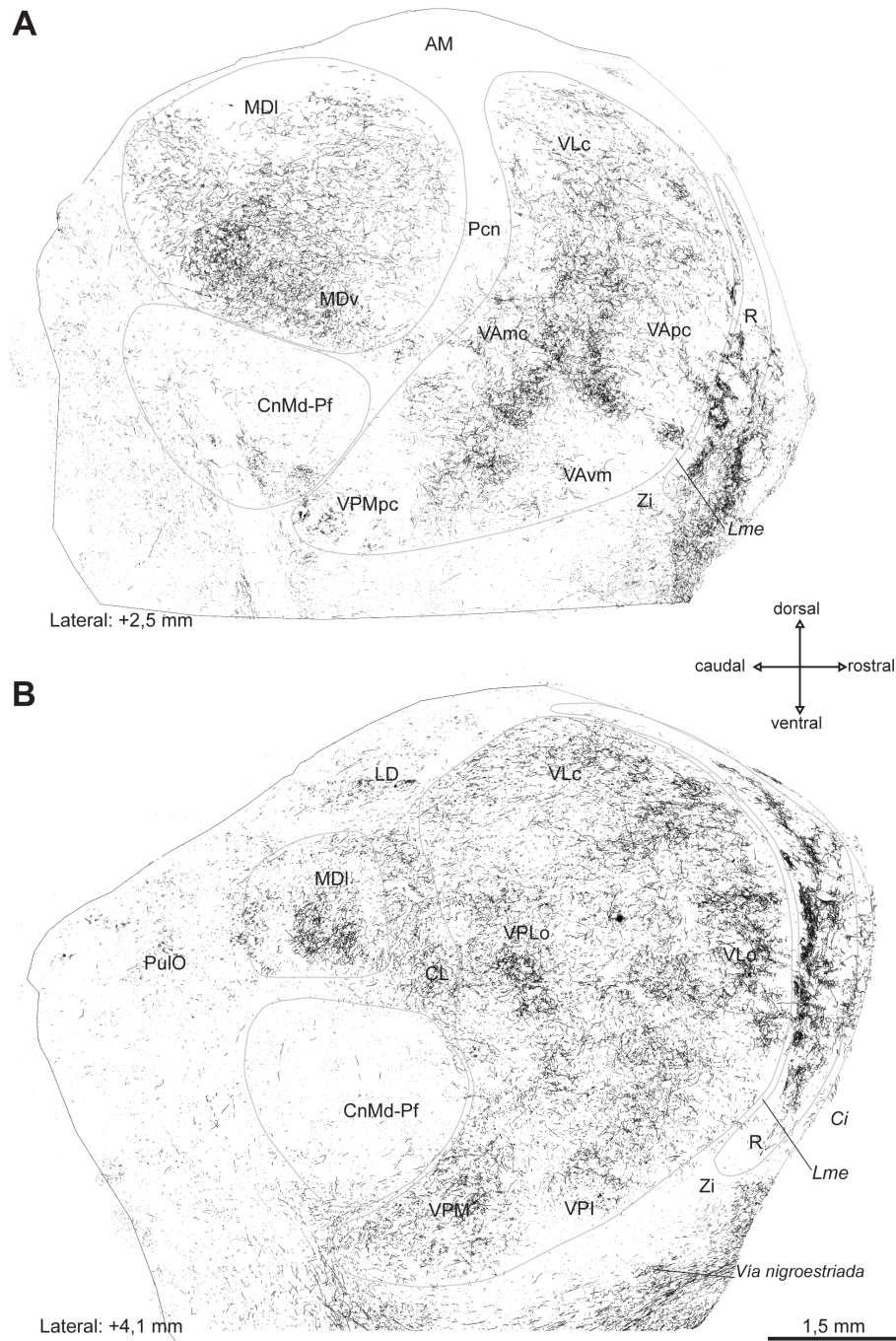


Figura 28. Distribución de axones inmunorreactivos para DAT en el tálamo de un macaco parkinsoniano grave. Se muestran dos cortes parasagitales representativos. La distancia estereotáctica respecto a la línea media se representa en el margen inferior izquierdo. La barra de calibración es común para los dos mapas. Ver lista de abreviaturas para identificar los núcleos talámicos.

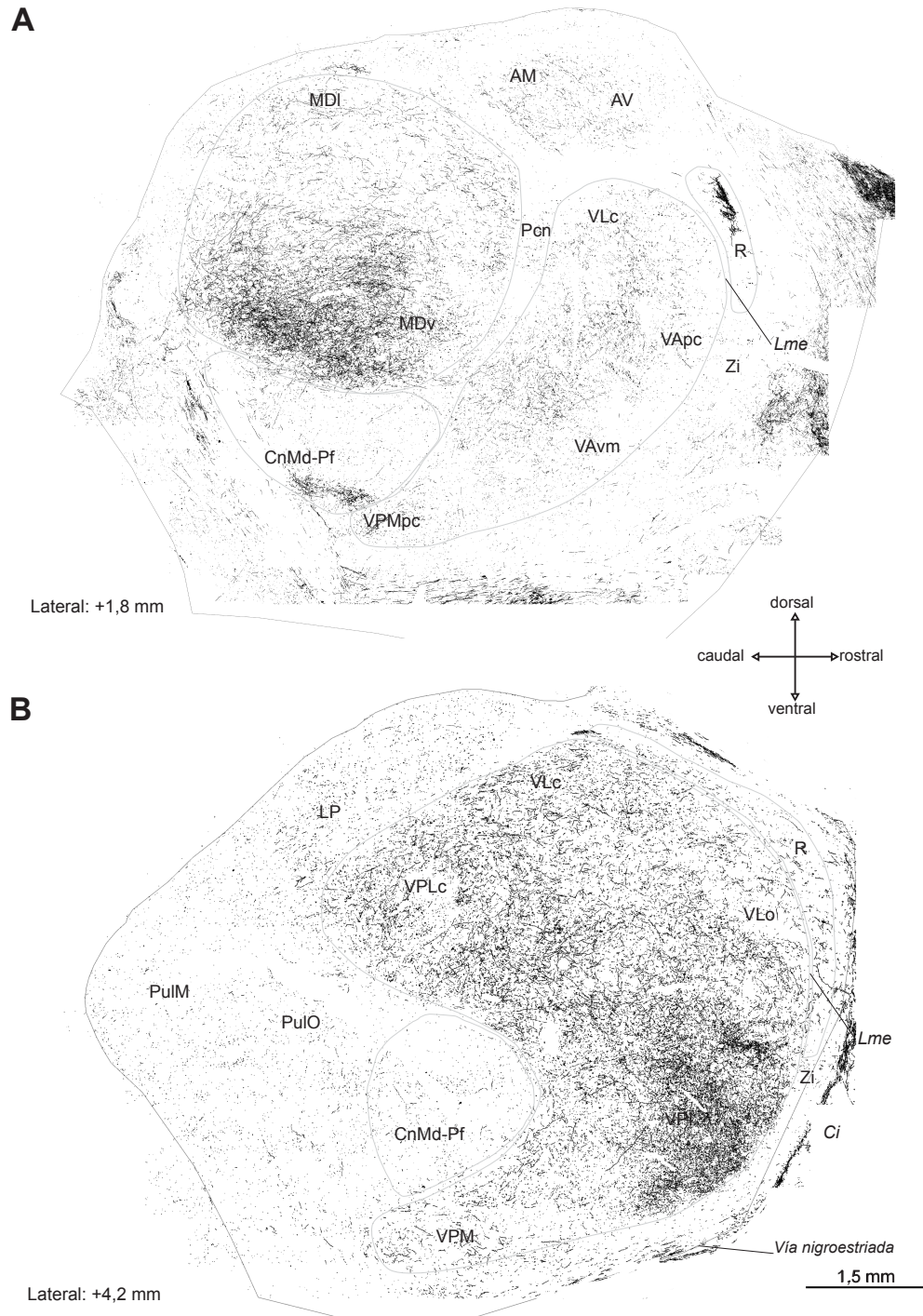


Figura 29. Distribución de axones inmunorreactivos para DAT en el tálamo de un macaco con síndrome parkinsoniano agudo. Se muestran dos cortes parasagitales representativos. La distancia respecto a la línea media se muestra en el margen inferior izquierdo. La barra de calibración es común para los dos mapas. Ver lista de abreviaturas para identificar los núcleos talámicos.

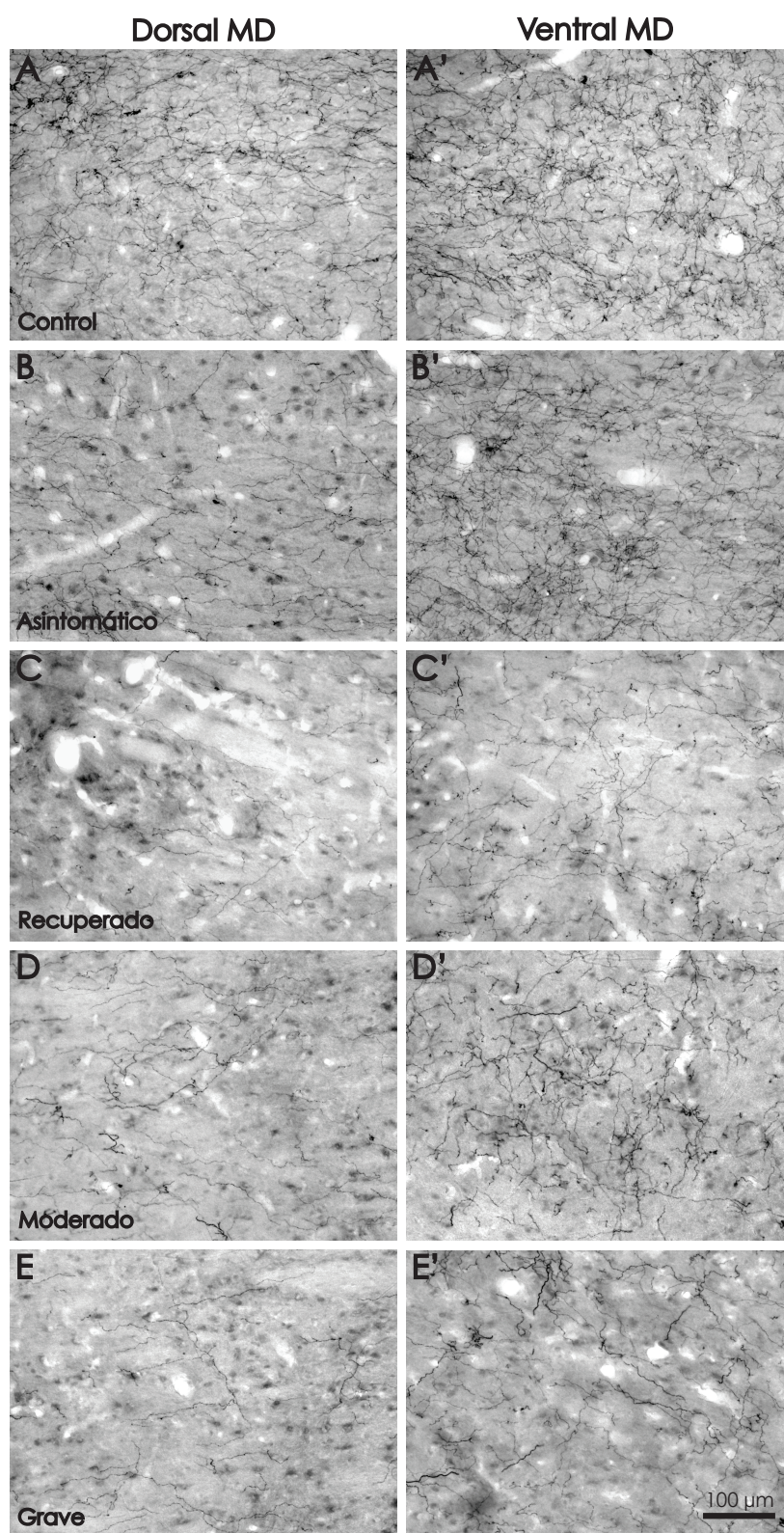


Figura 30. Distribución de axones DAT+ en el núcleo dorsomediano. Microfotografías del núcleo dorsomediano, zona dorsal (A-E) y zona ventral (A'-E'). Nótese la disminución de axones DAT+ en la región dorsal respecto al animal control (A) en los animales asintomáticos (B), recuperados (C), parkinsonianos moderados (D), parkinsonianos graves (E). En la región ventral (A') también hay una disminución de axones DAT+ pero es más marcada en animales parkinsonianos moderados y graves (D' y E' respectivamente). La barra de calibración es común para todas las microfotografías. MD: núcleo dorsomediano.

1.2. DISTRIBUCIÓN DE LA INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA EN NÚCLEOS DEL CIRCUITO MOTOR DE LOS GANGLIOS BASALES

1.2.1. Complejo centromediano-parafascicular

El complejo CnMd-Pf presenta una inervación dopaminérgica marcadamente inferior al resto de núcleos explorados (Figuras 24-29). Como se ha comentado previamente, la distribución de los axones dopaminérgicos DAT+ se localiza predominantemente en la región más medio-ventral del mismo, correspondiente a la porción Pf (Figura 24). Cualitativamente esta leve inervación se observa en todos los grupos experimentales (Figuras 24-29 y 31), aunque está prácticamente ausente en el grupo parkinsoniano grave (Figura 31).

1.2.2. Núcleos ventrales

Los núcleos ventrales tienen inervación dopaminérgica DAT+ a lo largo de todo su eje cráneo-caudal. No se observaron claras diferencias en cuanto a la distribución de los axones DAT+ entre los diferentes grupos (Figuras 24-29 y 32). Destaca en todos ellos, la importante densidad de inervación dopaminérgica de algunas regiones como el VPLo, y el VPM, incluido en el grupo parkinsoniano grave (Figura 32).

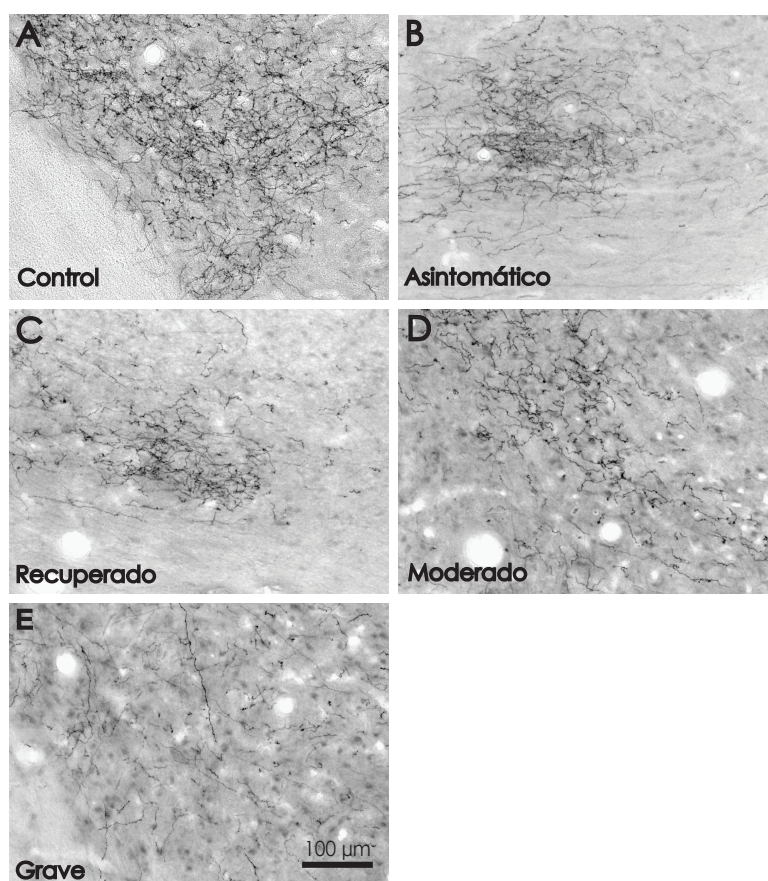


Figura 31. Distribución de axones DAT+ en el complejo centromediano-parafascicular. Microfotografías del núcleo centromediano parafascicular de un animal de cada grupo: control (A), asintomático (B), recuperado (C), parkinsoniano moderado (D), parkinsoniano grave (E). La barra de calibración es común para todas las microfotografías.

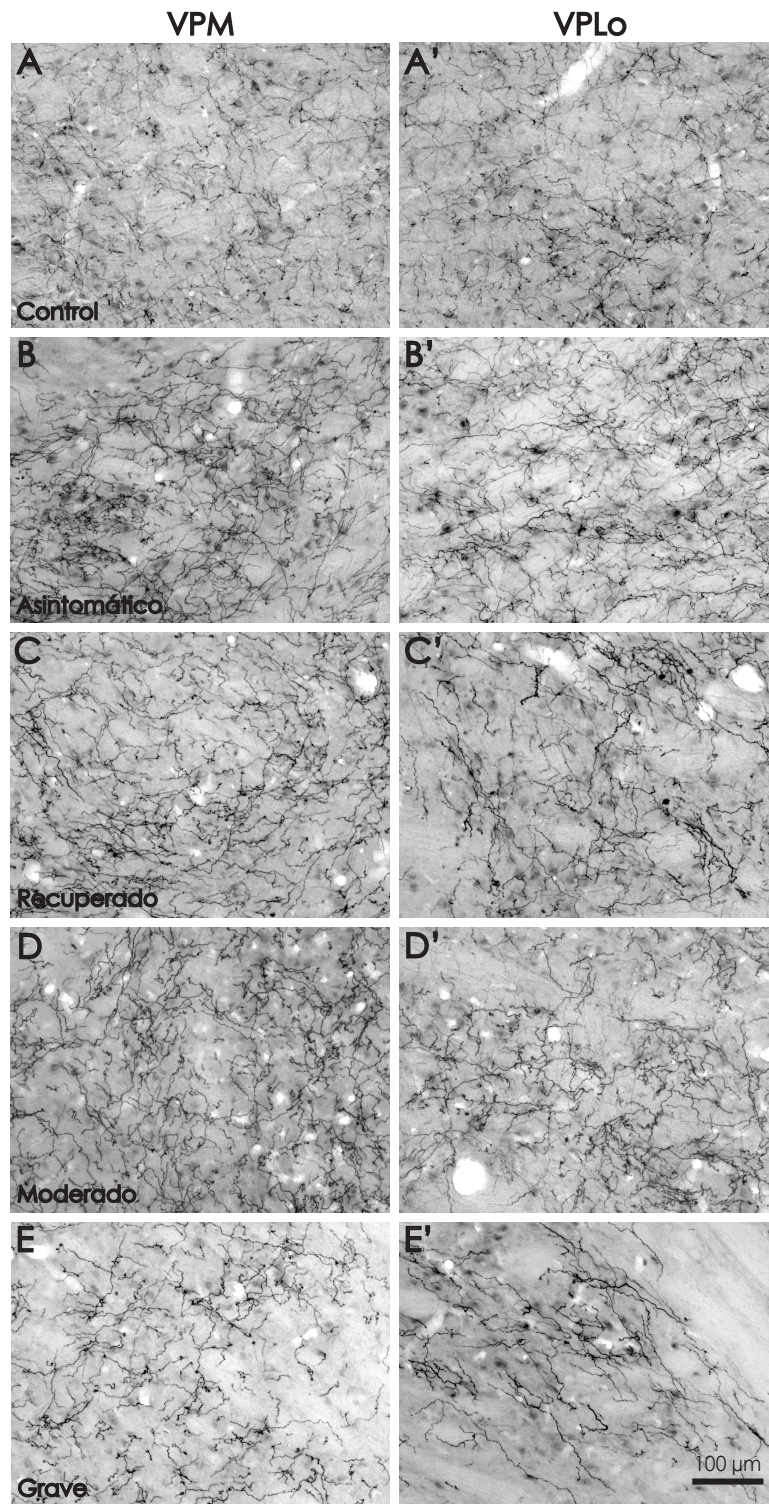


Figura 32. Distribución de axones DAT+ en núcleos ventrales. Microfotografías del núcleo ventral posterior medial (A-E) y de la porción oral del núcleo ventral posterior lateral (A'-E') de un macaco de cada grupo. La barra de calibración es común para todas las microfotografías. VPM: núcleo ventral posterior medial; VPLo: porción oral del núcleo ventral posterior lateral.

1.3. DISTRIBUCIÓN DE LA INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA EN EL NÚCLEO RETICULAR

La distribución de axones DAT+ en el núcleo R predomina en el polo anterior del núcleo en todos los grupos (Figuras 24-29). En los grupos de macacos parkinsonianos sintomáticos (parkinsonianos moderados y parkinsonianos graves) se observaron más axones DAT+ (Figuras 27 y 28) formando acúmulos de gran densidad axónica rodeados de axones de menor densidad (Figura 33). Este patrón se localiza sobre todo en la porción anterior del núcleo (Figuras 27 y 28).

1.4. MORFOLOGÍA DE LOS AXONES DAT+

En todos los núcleos talámicos analizados, la morfología de los axones seguía el patrón previamente descrito (García-Cabezas *et al.* 2007). Los axones DAT+ en los núcleos MD, CnMd-Pf y ventrales eran en su mayoría axones muy finos y varicosos, sobre los que se entremezclan en algunos núcleos axones gruesos que en ocasiones se agrupan en haces de axones. Es notable destacar que la morfología de los axones DAT+ en el núcleo R difiere de los axones DAT+ de los núcleos del tálamo dorsal. En el núcleo R los axones DAT+ destacan por ser gruesos y varicosos. La morfología de los axones DAT+ en el núcleo R no se modificaba en los macacos con síntomas (parkinsonianos moderados y graves) (Figura 34).

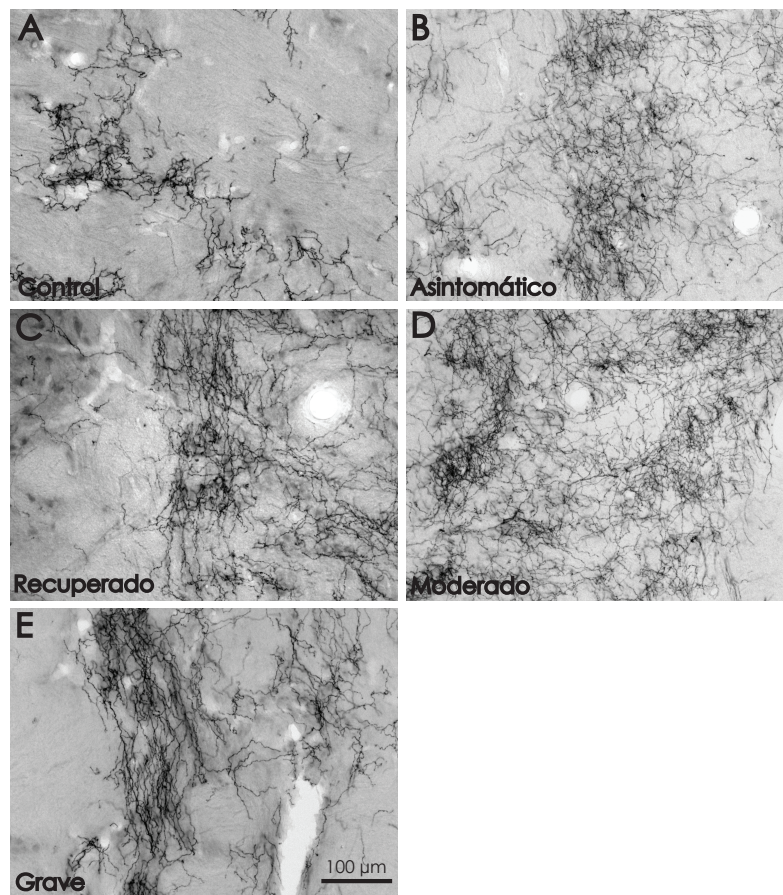


Figura 33. Distribución de axones DAT+ en el núcleo reticular. Microfotografías del polo anterior del núcleo reticular de un macaco de cada grupo. Nótese el incremento en la cantidad de axones DAT+ en el núcleo reticular en los grupos parkinsonianos moderados y parkinsonianos graves. La barra de calibración es común para todas las microfotografías.

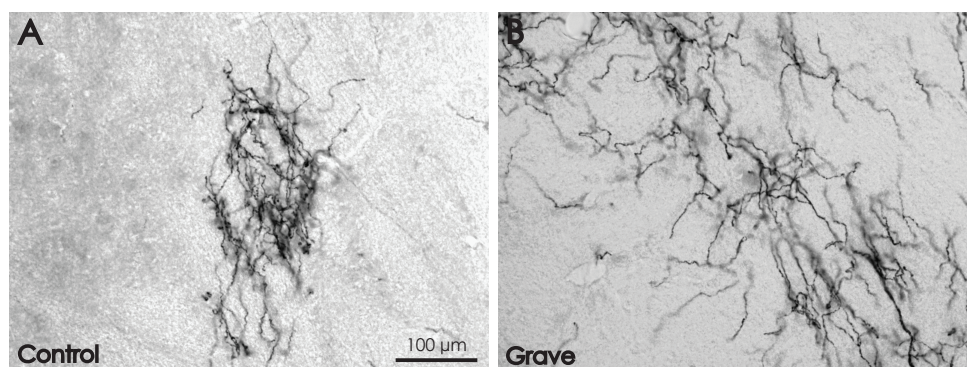


Figura 34. Morfología de axones DAT+ en el núcleo reticular. Microfotografías del polo anterior del núcleo reticular a nivel lateral en animal control (A) y animal parkinsoniano grave (B). La barra de calibración es común para todas las microfotografías.

2. ESTUDIO ESTEREOLÓGICO DE LA DENSIDAD DE LONGITUD DE AXONES DAT+

Se describen a continuación los hallazgos en la densidad de longitud de los axones DAT+ en los núcleos MD, CnMd-Pf, conjunto de los núcleos ventrales y núcleo R del tálamo. Con el objetivo de reducir la variabilidad e incrementar el poder estadístico del análisis también se agruparon los macacos experimentales atendiendo a si eran macacos sin síntomas (asintomáticos y recuperados) o con síntomas (parkinsonianos moderados y parkinsonianos graves). Los datos relativos a la longitud axónica DAT+ y el volumen de los núcleos en base a los cuales se obtuvo la densidad de longitud se muestran en la tabla 1 del Anexo.

2.1. DENSIDAD DE LONGITUD DE AXONES DAT+ EN EL NÚCLEO DORSOMEDIANO

El estudio estereológico en el núcleo MD mostró una disminución en la densidad de longitud de axones DAT+ en todos los monos tratados con MPTP, ocurriendo de forma paralela a la gravedad de los déficits motores, siendo este descenso estadísticamente significativo ($p=0,01$). La disminución en la densidad de longitud de axones DAT+ se inicia de forma precoz, observándose ya en el grupo de macacos asintomáticos, y fue máximo en los macacos del grupo parkinsoniano grave. El análisis *post-hoc* mostraba diferencias estadísticamente significativas entre el grupo parkinsoniano grave y el grupo control ($p=0,04$) y el grupo asintomático ($p=0,047$) (Figura 35A). Cuando se agruparon los macacos experimentales en macacos sin síntomas (asintomáticos y recuperados) o con síntomas (parkinsonianos moderados y parkinsonianos graves), se corroboró tales hallazgos ($p=0,02$). El análisis *post hoc* mostraba diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control comparado con el grupo sin síntomas ($p=0,02$) y el grupo parkinsoniano ($p=0,03$) (Figura 35B.)

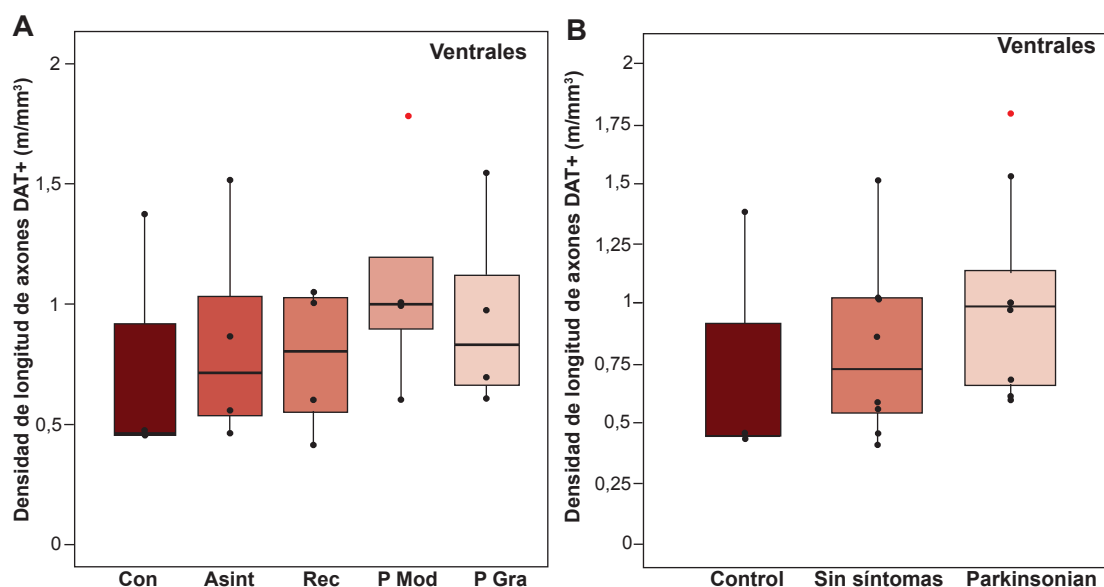


Figura 37. Densidad de longitud de axones DAT+ en los núcleos ventrales del tálamo.

A. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. B. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos tratados con MPTP y el grupo control. La línea central de las cajas representa la mediana. El límite alto y bajo de la caja representa el primer y tercer cuartil. Los extremos de las barras representan los valores mínimos y máximos. Los puntos representan los valores individuales de cada macaco de cada grupo. Los valores extremos se representan con punto rojo. Cont: controles; Asint: asintomáticos; Rec: recuperados; P Mod: parkinsonianos moderados; P Gra: parkinsonianos graves.

2.3. DENSIDAD DE LONGITUD DE AXONES DAT+ EN EL NÚCLEO RETICULAR

En el núcleo R se observó un incremento progresivo de la densidad de longitud de axones DAT+ en todos los grupos experimentales respecto al grupo control; si bien no se alcanzó la significación estadística ($p=0,06$) (Figura 38A).

Cuando se agruparon los macacos experimentales en macacos sin síntomas (asintomáticos y recuperados) o con síntomas (parkinsonianos moderados y parkinsonianos graves), sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0,01$). El análisis *post hoc* mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo con síntomas ($p=0,04$) (Figura 38B).

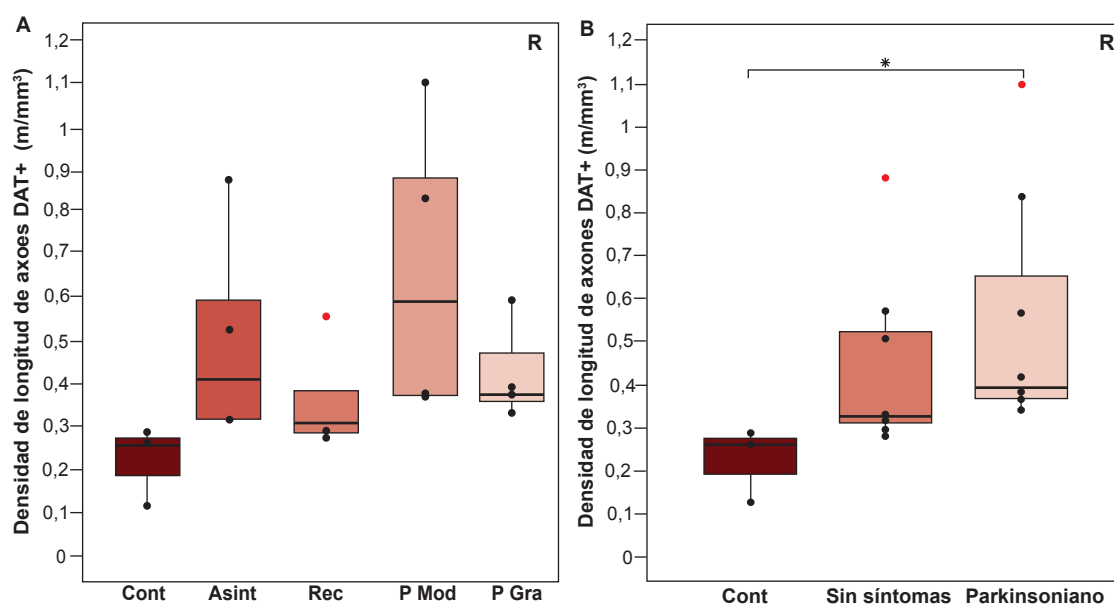


Figura 38. Densidad de longitud de axones DAT+ en el núcleo reticular del tálamo. Nótese el incremento de densidad de longitud axónica en los grupos de macacos tratados con MPTP respecto a controles. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos* al agruparlos grupos de animales sin síntomas (asintomático y recuperado) y con síntomas (parkinsoniano moderado y grave). La línea central de las cajas representa la mediana. El límite alto y bajo de la caja representa el primer y tercer cuartil. Los extremos de las barras representan los valores mínimos y máximos. Los puntos representan los valores individuales de cada macaco de cada grupo. Los valores extremos se representan con punto rojo. Cont: controles; Asint: asintomáticos; Rec: recuperados; P Mod: parkinsonianos moderados; P Gra: parkinsonianos graves.

2.4. MONO CON SÍNDROME PARKINSONIANO AGUDO. DENSIDAD DE LONGITUD DE AXONES DAT+

Este mono presentaba una depleción dopaminérgica variable, según el núcleo talámico estudiado. La densidad de longitud de axones DAT+ en el núcleo MD estaba disminuida respecto a los macacos controles, presentando una densidad de longitud de axones DAT+ similar a los macacos parkinsonianos graves (Figura 39A). En el complejo CnMd-Pf, la densidad de la longitud de axones DAT+ era similar a los macacos controles o macacos sin síntomas (asintomáticos y recuperados) (Figura 39B); mientras que la densidad de la longitud de axones dopaminérgicos DAT+ en el grupo de los núcleos ventrales de este mono no mostraba un comportamiento diferente (Figura 39C). En el núcleo R, el mono parkinsoniano agudo presentaba una longitud de axones DAT+ similar a los macacos controles (Figura 39D).

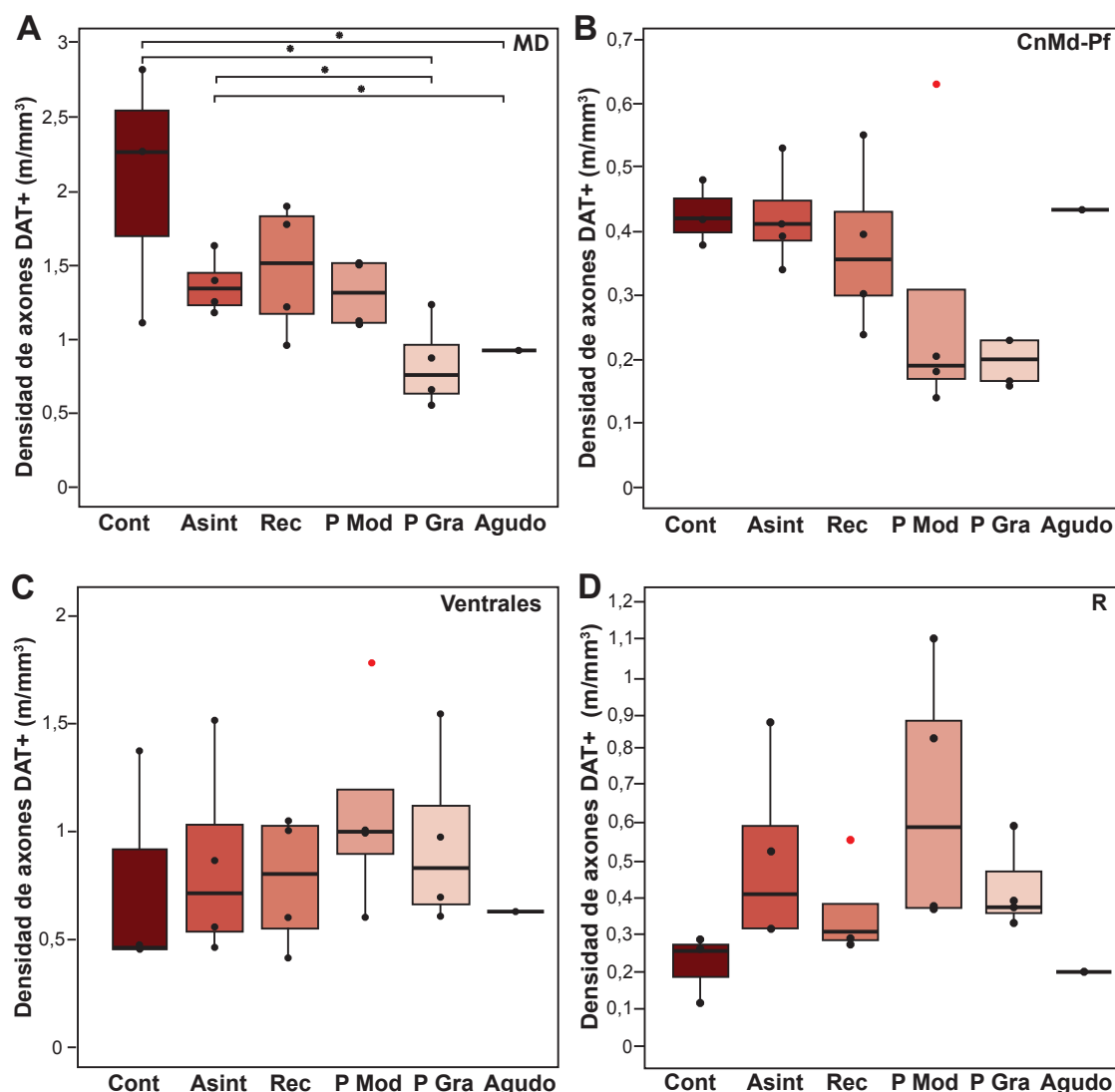


Figura 39. Densidad de axones DAT+ en los núcleos dorsomediano, centromediano-parafascicular, ventrales y reticular en los diferentes grupos y el mono parkinsoniano agudo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos*. La línea central de las cajas representa la mediana. El límite alto y bajo de la caja representa el primer y tercer cuartil. Los extremos de las barras representan los valores mínimos y máximos. Los puntos representan los valores individuales de cada macaco de cada grupo. Los valores extremos se representan con puntos rojos. Cont: controles; Asint: asintomáticos; Rec: recuperados; P Mod: parkinsonianos moderados; P Gra: parkinsonianos graves.

2.5. RESUMEN DE LA DENSIDAD DE LONGITUD DE LOS AXONES DAT+

El núcleo MD presenta la mayor densidad de longitud de axones DAT+, seguido por los núcleos ventrales. El núcleo R y CnMd-Pf presentan una menor inervación respecto a los dos grupos anteriores.

La densidad de longitud de axones DAT+ del tálamo de primates está afectada en el núcleo MD desde estadios muy iniciales del parkinsonismo por MPTP, presente en

macacos asintomáticos desde el punto de vista motor, con una disminución progresiva hasta los macacos parkinsonianos graves, que son los que muestran la máxima depleción. En el complejo CnMd-Pf existe una disminución significativa de la densidad de longitud de axones DAT+ en los grupos de macacos sintomáticos (parkinsoniano moderado y parkinsoniano grave). La densidad de longitud de axones DAT+ presenta un comportamiento inverso en el núcleo R, con un aumento progresivo hasta una densidad máxima en los grupos de macacos sintomáticos (parkinsoniano moderado y parkinsoniano grave).

El mono parkinsoniano agudo tiene un comportamiento complejo. La densidad de longitud de axones DAT+ en los núcleos CnMd-Pf, ventrales y R es similar al grupo control, pero en el núcleo MD la densidad se encuentra disminuida respecto al grupo control (Figura 39).

Los datos individuales de las longitudes y densidades de longitud axonal se muestran en la Tabla 1 del Anexo.

3. CORRELACIONES DE LA INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA EN LOS NÚCLEOS TALÁMICOS Y MODELOS PREDICTIVOS

Se realizó una matriz de correlaciones entre la densidad de longitud de axones DAT+ en los núcleos talámicos, el estado motor, la densidad óptica de DAT en estriado y el número de neuronas dopaminérgicas de los grupos A8, A9, A10 y A11, utilizando los datos de esta tesis y datos publicados previamente con los mismos animales experimentales (Blesa *et al.* 2012) (Figura 40).

La densidad de longitud de axones DAT+ en el núcleo MD presentaba una correlación negativa moderada con la escala motora ($r=-0,61$, $p=0,006$), y una correlación positiva alta con la densidad óptica DAT en estriado ($r=0,70$, $p=0,0009$). Así mismo, presentaba una correlación positiva moderada con las neuronas dopaminérgicas TH+ del grupo A8, A9 y A10 ($r=0,6$, $p=0,02$; $r=0,76$, $p=0,007$; $r=0,57$, $p=0,01$, respectivamente) (Figura 40).

La densidad de longitud de axones DAT+ en el complejo CnMd-Pf presentaba una correlación negativa moderada con la escala motora ($r=-0,58$, $p=0,02$), y una correlación positiva moderada con la densidad óptica DAT en estriado ($r=0,5$ $p=0,01$). Así mismo, tenía una correlación positiva moderada con las neuronas dopaminérgicas TH+ de A9 y A10 ($r=0,51$, $p=0,02$ y $r=0,55$, $p=0,01$, respectivamente) (Figura 40).

Estos datos indican que la depleción de innervación DAT+ en el núcleo MD y CnMd-Pf se asocia con el aumento de los síntomas motores y con la depleción de innervación DAT+ en el estriado y de neuronas dopaminérgicas en los grupos A8 (MD), A9 y A10 (MD y CnMd-Pf) del mesencéfalo.

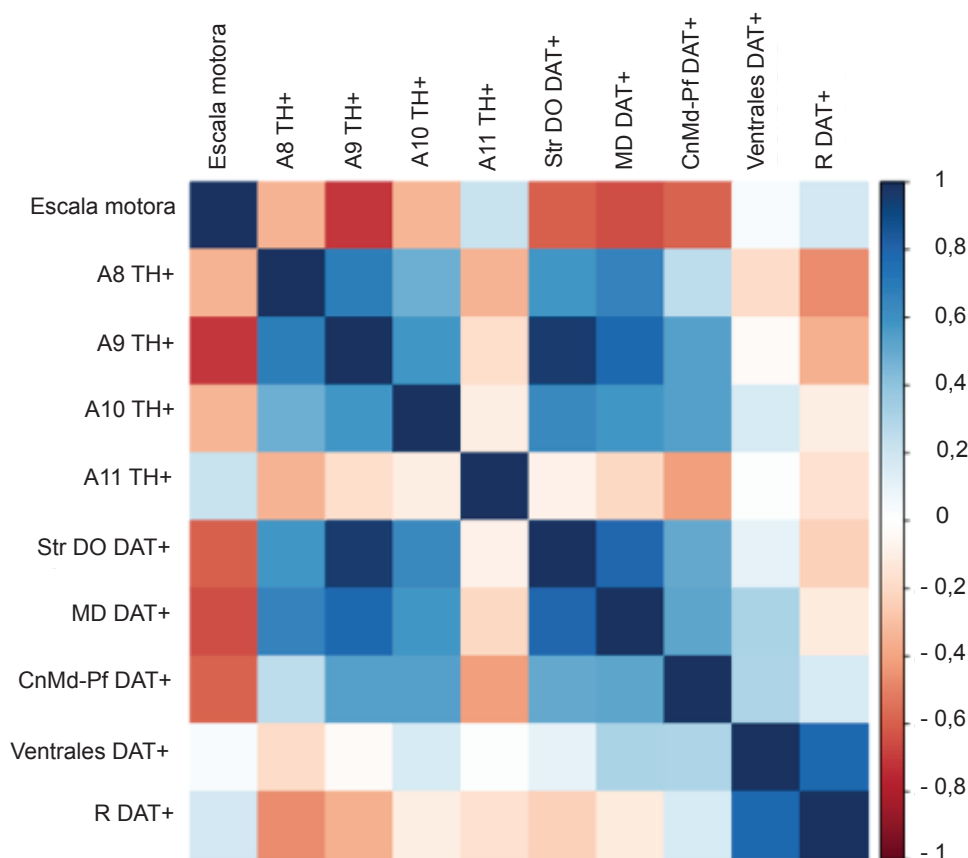


Figura 40: Matriz de correlaciones. Matriz de correlaciones entre las densidades de longitud de axones DAT+ en el núcleo dorsomediano (MD DAT+), en el núcleo centromediano-parafascicular (CnMd-Pf DAT+), los núcleos ventrales (Ventrales DAT+) y el núcleo reticular (R DAT+), la escala motora, la densidad óptica de DAT en estriado (Str DO DAT+) y el número de neuronas dopaminérgicas TH+ en los grupos A8, A9, A10 y A11 (A8 TH+, A9 TH+, A10 TH+, A11 TH+, respectivamente). En el margen derecho se muestra la escala de colores de la dirección y grado de correlación. Correlación positiva en tonalidad de color azul. Correlación negativa en tonalidad de color rojo.

El conjunto de los núcleos ventrales, al contrario que los núcleos descritos anteriormente, no presentaron correlaciones positivas o negativas moderadas, altas o muy altas con ninguna de las variables analizadas.

La densidad de axones DAT+ en el núcleo R presentaba una correlación negativa moderada con el número total de neuronas dopaminérgicas TH+ del grupo A8 ($r=-0,47$, $p=0,07$).

En el análisis de modelos predictivos de regresión, la densidad de longitud de axones DAT+ en el núcleo MD mostraba una relación no lineal positiva con las neuronas dopaminérgicas TH+ de A9 ($R^2=0,43$, $p=0,001$) y con las neuronas TH+ de A10 ($R^2=0,32$, $p=0,05$) (Figura 41A-B). La densidad de longitud de axones DAT+ en el complejo CnMd-Pf mostraba una relación no lineal positiva con el número de neuronas TH+ del grupo A9 ($R^2=0,26$, $p=0,01$) y A10 ($R^2=0,32$, $p=0,04$) (Figura 41C-D).

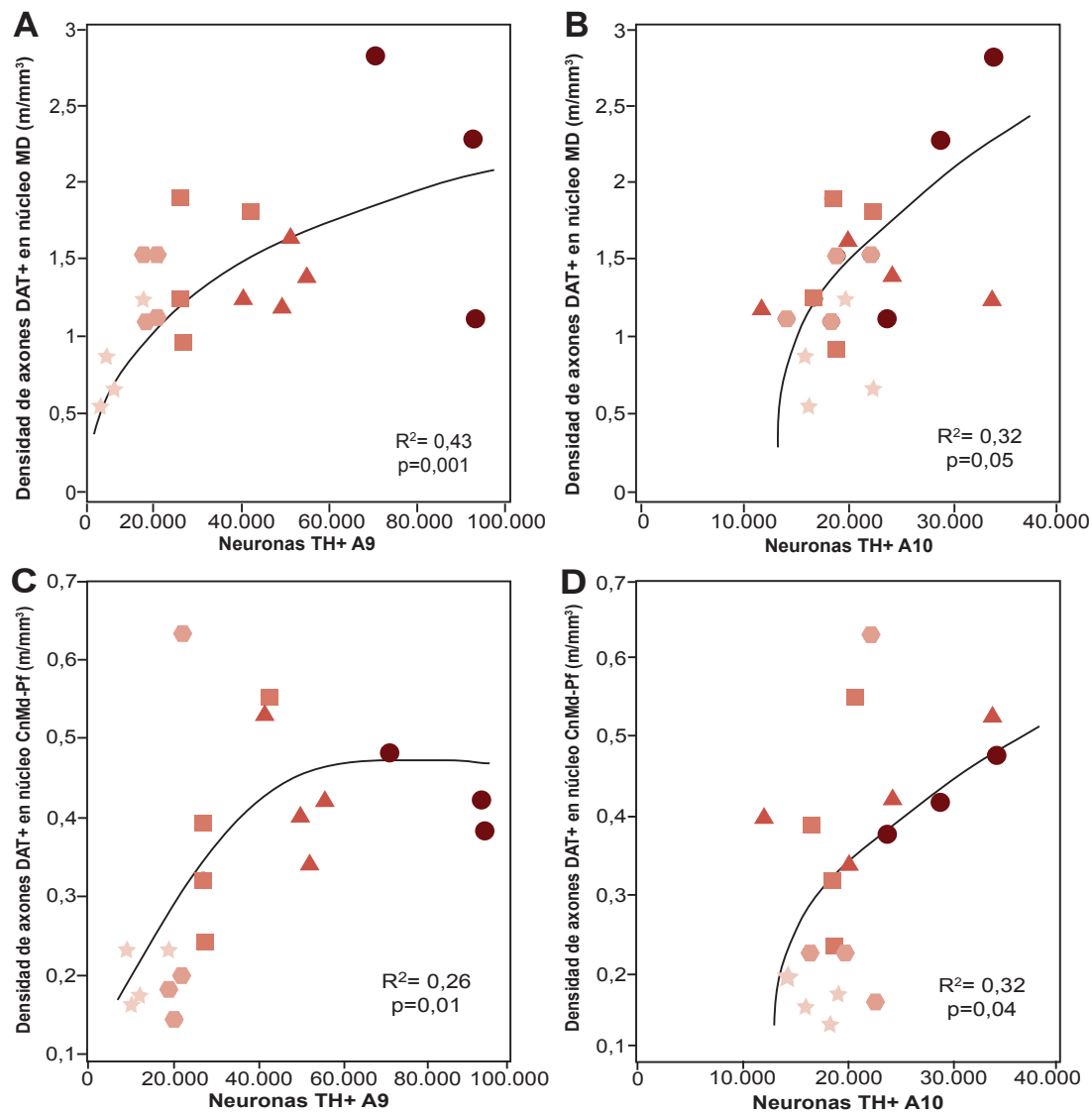


Figura 41. Representación del análisis de regresión entre la densidad de axones DAT+ y el número de neuronas mesencefálicas TH+. Regresión no lineal significativa entre la densidad de longitud de axones DAT+ en el núcleo MD y las neuronas dopaminérgicas TH+ en A9 (A) y en A10 (B). Regresión no lineal significativa entre la densidad de longitud de axones DAT+ en el núcleo CnMd-Pf y las neuronas dopaminérgicas TH+ en A9 (C) y en A10 (D).

V. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que la inervación dopaminérgica del tálamo está afectada en un modelo progresivo de EP en primates no humanos intoxicados con MPTP. Este estudio es el primero que analiza el sistema dopaminérgico talámico en este modelo de EP desde puntos de vista cualitativo y cuantitativo. Los datos obtenidos demuestran que los axones dopaminérgicos del tálamo tienen una diferente sensibilidad al MPTP, resultando en una afectación heterogénea de los núcleos analizados. En el núcleo MD desde estadios muy iniciales existe una disminución de la densidad de axones DAT+, con un descenso progresivo hasta los macacos parkinsonianos graves. En el núcleo CnMd-Pf esta disminución ocurre más tardíamente, en los grupos de macacos sintomáticos (parkinsonianos moderados y graves). Por su parte, en el núcleo R se produce un aumento progresivo de la densidad de axones DAT+ hasta una densidad máxima en los grupos de macacos sintomáticos (parkinsonianos moderados y graves). Antes de discutir los resultados concretos hacemos unas consideraciones acerca de los métodos utilizados y su repercusión en los datos obtenidos.

1. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

1.1. EL MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON CON MPTP

El modelo de intoxicación con MPTP es probablemente el más relevante actualmente para estudiar la fisiopatología de la EP en animales. Este modelo reproduce la muerte de neuronas dopaminérgicas y la consecuente depleción estriatal de dopamina, al tiempo que reproduce la totalidad de los síntomas motores que se ponen de manifiesto en la EP (Burns *et al.* 1983; Masilamoni and Smith 2017).

En este trabajo se ha utilizado un modelo de intoxicación progresiva con dosis relativamente bajas de MPTP: 0,5 mg/kg administradas en intervalos de 15 días (Blesa *et al.* 2010). El amplio intervalo de tiempo entre dosis permitió un buen control de la gravedad del cuadro motor, pudiéndose evaluar los síntomas tras cada dosis. Esto permite generar un modelo progresivo: 1) se puede interrumpir la intoxicación antes de la aparición de los síntomas; o bien 2) una vez que estos sean evidentes, permitiendo la recuperación; o bien 3) continuar hasta que los síntomas motores parkinsonianos sean estables. Otros modelos usan administraciones diarias de MPTP (Bezard *et al.* 1997,

2001; Gagnon *et al.* 2016). A diferencia del modelo que hemos utilizado, la administración continuada conduce a una acumulación de MPP+ haciendo que el estado motor continúe empeorando incluso una vez que la intoxicación haya terminado (Meissner *et al.* 2003), complicando el análisis de las manifestaciones motoras y de la relación dosis respuesta.

La evaluación del grado de parkinsonismo se realizó mediante la escala de Kurlan (Kurlan *et al.* 1991) que a diferencia de otras escalas motoras presenta una gran sensibilidad para la evaluación de los signos motores parkinsonianos (Imbert *et al.* 2000). Una de las limitaciones de este estudio es la ausencia de información sobre el estado no motor de los animales, especialmente de los asintomáticos. En el estadio asintomático, o pre-motor en animales intoxicados, puede haber síntomas no motores, como sucede en la EP (Postuma *et al.* 2012). En monos tratados con MPTP que no presentaban alteraciones motoras, se han descrito déficits cognitivos (Schneider and Pope-Coleman 1995; Decamp and Schneider 2004), similares a lo observado en pacientes con EP en estadios iniciales (Foltynie *et al.* 2004; Aarsland *et al.* 2009). No obstante, la ausencia de un estándar validado, así como la laboriosidad del paradigma, lejano al objetivo primario del estudio inicial (Blesa *et al.* 2010), hizo que no se incluyera en el presente trabajo el estudio de síntomas no motores.

1.2. INMUNODETECCIÓN DEL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA

El sistema dopaminérgico talámico se ha estudiado mediante inmunohistoquímica frente a DAT, ya que es un marcador específico dopaminérgico expresándose en el soma, dendritas y terminales axónicas de neuronas dopaminérgicas (Ciliax *et al.* 1995; Miller *et al.* 1997; Lewis *et al.* 2001). Además, la conocida expresión de dicho transportador a lo largo del segmento axonal, con mayor expresión a nivel de los botones sinápticos, nos garantizaba un adecuado marcaje para la ulterior cuantificación de longitud axonal (Ciliax *et al.* 1995; García-Cabezas *et al.* 2009). La limitación de este anticuerpo es que no todos los grupos dopaminérgicos expresan DAT y, los que lo expresan, no lo hacen en la misma intensidad (Shimada *et al.* 1992; Ciliax *et al.* 1995; Haber *et al.* 1995; Sánchez-González *et al.* 2005). Se sabe que parte de la innervación dopaminérgica del tálamo es DAT-, pero ésta se concentra en los núcleos de la línea media, no incluidos en este estudio (Sánchez-González *et al.* 2005; García-Cabezas *et*

al. 2007). Los grupos dopaminérgicos que muestran vulnerabilidad en la EP, y al MPTP, son grupos dopaminérgicos que tienen expresión de DAT (Damier *et al.* 1999; Blesa *et al.* 2012), por lo que el objetivo primario de este trabajo está abordado correctamente utilizando el anticuerpo anti-DAT para marcar la innervación dopaminérgica en núcleos talámicos laterales a la línea media.

1.3. ESTUDIO ESTEREOLÓGICO

El método estereológico utilizado en este trabajo permite un análisis cuantitativo riguroso sin hacer presunciones sobre la forma, tamaño o aleatoriedad de los objetos de estudio. El uso de la hemiesfera como sonda para estimar la longitud tiene la ventaja de ser isotrópica por sí misma, no precisando de la orientación en distintos planos para su adecuado uso, como ocurre con los planos virtuales (Larsen *et al.* 1998; Mouton *et al.* 2002). El método permite obtener valores cuantitativos de estructuras tridimensionales a partir de su muestreo en dos dimensiones, incluyendo estrictas estrategias de muestreo y la aplicación de modelos matemáticos bien establecidos (Mouton *et al.* 2002). Este método estereológico ha sido usado previamente generando resultados imparciales, confiables y más eficientes que otros métodos de análisis cuantitativo (Raghanti *et al.* 2008; Kreczmanski *et al.* 2009).

Para este estudio, se usaron cortes parasagitales porque ofrecen mayor información, frente a los cortes coronales, sobre la distribución de la innervación dopaminérgica del tálamo de primates (García-Cabezas *et al.* 2007, 2009). En particular, son óptimos para facilitar la cuantificación estereológica del núcleo R, donde la porción anterior es la más densamente innervada por dopamina, y del núcleo MD cuyos axones DAT⁺ se disponen mayoritariamente a lo largo del eje antero-posterior del núcleo (García-Cabezas *et al.* 2009).

2. LOS NÚCLEOS DEL TÁLAMO RESPONDEN HETEROGÉNEAMENTE A LA INTOXICACIÓN CON MPTP

Los datos de este estudio, tanto cualitativos como los cuantitativos, demuestran una diferente sensibilidad al MPTP de los axones dopaminérgicos del tálamo, con una respuesta heterogénea tanto en lo relativo a la cantidad de axones DAT⁺ como al

momento de aparición de los cambios. Hemos observado tanto descenso en la densidad de axones DAT+ (en los núcleos MD y CnMd-Pf), aumento de dicha densidad (en el núcleo R), como ausencia de modificaciones (en el conjunto de los núcleos ventrales). Además, el momento de aparición de los cambios en los axones DAT+ es específica para cada núcleo: precoz en el núcleo MD y núcleo R y tardía en el núcleo CnMd-Pf.

En el núcleo MD se produce un descenso precoz en la innervación dopaminérgica, ya presente en macacos asintomáticos desde el punto de vista motor, y máxima en los parkinsonianos graves (Figura 35). El núcleo CnMd-Pf tiene menos innervación dopaminérgica que el núcleo MD y conserva la innervación en las fases presintomáticas del parkinsonismo descendiendo en estadios sintomáticos (Figura 36). En el conjunto de los grupos ventrales no se objetivó variación en la densidad de axones DAT+ (Figura 37). Quizás esta conservación de axones dopaminérgicos obedece a que, por dificultades técnicas, no hemos delimitado y estudiado individualmente los núcleos del complejo ventral del tálamo, por lo que es posible que, un estudio ulterior de núcleos ventrales específicos pueda mostrar efectos del MPTP sobre la densidad de axones DAT+. Por su parte, en el núcleo R hay un aumento progresivo de la densidad de axones DAT+, que es máxima en los animales con síntomas motores (Figura 38).

Los mapas de distribución de axones DAT+ confirman y complementan los datos cuantitativos. En particular en los núcleos MD y R es evidente el descenso y aumento, respectivamente, en la densidad de axones DAT+ a medida que progresa el parkinsonismo (Figuras 30 y 33, respectivamente). Además, los mapas proporcionan información topográfica adicional. En el núcleo MD, la pérdida de axones DAT+ es más notable en regiones dorsales, tanto mediales como laterales (Figuras 24-28 y 30), conectadas principalmente con corteza prefrontal orbitofrontal y dorsolateral (Goldman-Rakic and Porrino 1985). En el núcleo R, el aumento de axones DAT+ se aprecia especialmente en las regiones más anteriores del núcleo (Figuras 24-28 y 33), correspondientes a los sectores prefrontal y motor (Stepniewska *et al.* 1994; Zikopoulos and Barbas 2006).

En los núcleos ventrales no se apreciaron claros cambios cualitativos en la densidad de axones DAT+ (Figuras 24-28) en coherencia con los datos cuantitativos; apreciándose la preservación de la importante innervación dopaminérgica de áreas

concretas del conjunto de los núcleos ventrales, como es en el VLo (Figuras 24-28 y 32).

3. MECANISMOS SUBYACENTES A LA RESPUESTA DE LOS AXONES DOPAMINÉRGICOS TALÁMICOS A LA INTOXICACIÓN CON MPTP

La densidad de axones DAT+ en los núcleos MD y CnMd-Pf está disminuida en los macacos tratados con MPTP (Figuras 35-36). Este descenso correlaciona con el descenso en el número neuronas TH+ de los grupos dopaminérgicos mesencefálicos (Figura 40), que es diferente según el núcleo talámico analizado, reflejo también de la heterogeneidad de la innervación dopaminérgica. Esto plantea la posibilidad de que el descenso en la innervación DAT+ sea secundaria a un proceso de degeneración axonal asociado a la degeneración neuronal.

En el núcleo MD, el descenso de la innervación dopaminérgica DAT+ se correlaciona con la densidad óptica TH y DAT en el estriado, así como con la disminución del número de neuronas dopaminérgicas de los grupos mesencefálicos, datos todos ellos a favor de que el proceso de pérdida ocurre en paralelo (Figura 40). De hecho, el 43% de la variación de la densidad de longitud de los axones DAT+ en el núcleo MD se explica por el número de neuronas TH+ de A9, y en un 32% por las de A10 (Figura 41). En macacos el origen de la innervación dopaminérgica del núcleo MD, proviene fundamentalmente de los grupos dopaminérgicos A11, A10 y A8, y en mucha menor medida de A9 (Sánchez-González *et al.* 2005); a diferencia de lo que sucede en ratones. En ratones, neuronas TH+ de A9 envían axones que se ramifican en el núcleo MD (Cebrián and Prensa 2010), en forma análoga a la ramificación en estriado (Matsuda *et al.* 2009). Si en macacos las neuronas dopaminérgicas de A9 proyectaran con extensas ramificaciones al núcleo MD, entonces aun habiendo pocas neuronas TH+ en A9 que proyectan al MD, en comparación con otros grupos dopaminérgicos, la depleción neuronal en A9 explicaría el mayor porcentaje de descenso en la densidad de longitud de axones DAT+. Además, esta hipótesis es consistente con la disminución precoz, ya en fases asintomáticas del modelo, tanto de neuronas TH+ de A9 (Blesa *et al.* 2012), como de axones DAT+ en MD. Otra posibilidad es que el número de neuronas dopaminérgicas de A9 proyectando al núcleo MD sea mayor al previamente descrito.

En el núcleo CnMd-Pf, se produce una disminución de la densidad de axones DAT+, de hasta del 47%, en parkinsonianos graves respecto a controles (Figura 36). Este descenso tiene una correlación moderada baja con la densidad óptica TH y DAT del estriado (Figura 40). Esto sugiere que el proceso de pérdida podría ocurrir en paralelo pero no al mismo ritmo. La presencia de un posible origen diverso de la innervación dopaminérgica del CnMd-Pf no tan predominante de A9 o A10, como se refleja en el modelo predictivo de regresión (Figura 41), apoyaría también estos hallazgos.

En el núcleo R ocurre una situación inversa y sorprendente, pues presenta un incremento de la densidad de longitud de axones DAT+ que aumenta conforme avanza el parkinsonismo. La densidad de longitud de axones DAT+ en el núcleo R no se correlaciona con el número de neuronas dopaminérgicas, pero se produce de forma paralela a la gravedad del parkinsonismo: a mayor grado de parkinsonismo mayor densidad de longitud de axones dopaminérgicos (Figuras 24-28, 33 y 38). Este es el primer trabajo en el que se describe una hiperinnervación dopaminérgica fuera del circuito de los ganglios basales en el modelo MPTP.

Este aumento de la innervación dopaminérgica en el núcleo R puede obedecer a gemación (“sprouting”) de axones DAT+ previos. Sería un fenómeno análogo a la hiperinnervación descrita en el estriado y en el GPi de ratones y monos tratados con MPTP (Bezard *et al.* 2000; Song and Haber 2000; Gagnon *et al.* 2018). En el estriado, en presencia de una pérdida global de axones dopaminérgicos producida por el MPTP, el aumento de la innervación dopaminérgica ha sido propuesto como mecanismo compensatorio. Esta hiperinnervación dopaminérgica estriatal actuaría retrasando la expresión de los síntomas motores aun cuando la depleción axónica global ya está presente (Bezard *et al.* 2001; Meissner *et al.* 2003; Blesa *et al.* 2017). No obstante, en el núcleo R, y también en el GPi (Gagnon *et al.* 2018), se produce un aumento neto de la longitud y densidad de axones dopaminérgicos, por lo que los mecanismos subyacentes a la hiperinnervación dopaminérgica en estos núcleos pueden ser diferentes a los que operan en el estriado.

En el estriado de monos tratados con MPTP, los axones surgidos del *sprouting* compensatorio tienen mayor número de ramificaciones respecto a los axones

degenerados remanentes (Song and Haber 2000). El análisis cualitativo microscópico, de los axones DAT+ en el núcleo R de los macacos tratados con MPTP, no mostraba diferencias respecto a los axones DAT+ en el mismo núcleo de los macacos controles (Figura 34). En el estudio de Song and Haber hay un menor tiempo entre la intoxicación con MPTP y el sacrificio de los animales, por lo que podrían existir rasgos morfológicos característicos iniciales en los axones neo-formados, que posteriormente adquieren la forma característica de los axones DAT+.

El número de varicosidades axónicas no ha sido analizado en este trabajo. La presencia de aumento en la longitud total axónica, sin variación en el número de varicosidades por unidad de longitud axónica podría apoyar la presencia de axones neoformados por mecanismos de *sprouting*. Este argumento ha sido propuesto por Gagnon *et al.* quienes en otro modelo de mono MPTP, mostraron una hiperinervación de fibras TH+ en el GPi, sin cambio en el número de varicosidades por unidad de longitud axónica (Gagnon *et al.* 2018).

Por otra parte, los cambios observados en la densidad de longitud de axones DAT+ en los núcleos talámicos podrían ser secundarios a cambios en la expresión de DAT en dichos axones. La expresión de DAT depende del estado funcional de disponibilidad de dopamina en las sinapsis (Mortensen and Amara 2003), así como del nivel de actividad neuronal, es decir: un incremento de la actividad neuronal, produce un cambio en la expresión de DAT, con aumento de la expresión del transportador (Padmanabhan *et al.* 2008). De esta manera, el descenso de la densidad de longitud de axones DAT+ podría ser secundaria a una menor expresión de DAT como consecuencia de la disfunción dopaminérgica. El descenso en la disponibilidad de dopamina y/o una menor actividad de los somas de origen de los axones produciría una menor expresión del transportador. Esta hipótesis explicaría los datos del animal parkinsoniano agudo, donde ante una intoxicación aguda se ha producido una depleción dopaminérgica de los núcleos talámicos y del estriado (Blesa *et al.* 2012), sin afectar al recuento celular de neuronas TH+ de los grupo dopaminérgicos mesencefálicos (Blesa *et al.* 2012).

En el núcleo R, el aumento de la densidad de axones DAT+ podría depender de un aumento en la síntesis y expresión de DAT en axones que antes de la intoxicación con MPTP no expresaban DAT o lo hicieran a niveles indetectables. Es interesante

señalar que en el ratón se han descrito diferentes subpoblaciones de neuronas TH⁺ que proyectan al núcleo R. Concretamente, hay una población de neuronas glutamatérgicas en A9 que proyectan al núcleo R y co-expresan TH (Antal *et al.* 2014). Se podría especular que mientras unas terminales degeneran y son más sensibles al proceso neurodegenerativo, otras terminales incrementan su actividad. Este aumento de actividad favorecería el cambio y aumento de la síntesis y expresión del transportador dopaminérgico en las terminales. En cualquier caso, sea secundario a un fenómeno de *sprouting* o a un cambio dinámico de la expresión de DAT, el cambio en la densidad de longitud de axones DAT⁺ en el núcleo R sería el resultado de una adaptación funcional al daño mesoestriatal, similar a la hiperinervación dopaminérgica descrita en el GPi del macaco MPTP (Gagnon *et al.* 2018).

4. COMPARACIÓN CON ESTUDIOS PREVIOS

Los datos de este estudio confirman y amplían descripciones previas realizadas con métodos bioquímicos, inmunohistoquímicos y de neuroimagen, que sugerían una afectación del sistema dopaminérgico talámico en este mismo modelo experimental y en cerebros de humanos con EP (Piffl *et al.* 1990; Freeman *et al.* 2001; Brownell *et al.* 2003).

Los datos bioquímicos sobre la concentración de dopamina en el tálamo de macacos tratados con MPTP proceden de estudios realizados con cromatografía líquida (Piffl *et al.* 1990, 1991). En estos trabajos se encuentran datos dispares acerca de la concentración de dopamina talámica. En el núcleo MD de monos tratados con MPTP, Piffl *et al.* describieron una disminución de la concentración de dopamina, la cual estaba presente desde estadios asintomáticos (Piffl *et al.* 1990, 1991). No obstante, en estudios posteriores no se replicaron tales hallazgos (Piffl *et al.* 2013). En el núcleo CnMd-Pf, los núcleos VA y VL y en el núcleo R tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de dopamina entre los animales controles y animales parkinsonianos (Piffl *et al.* 2013). Las características metodológicas de la cromatografía líquida limitan la precisión de los datos obtenidos: mínimas variaciones de dopamina pueden no ser detectadas, más aun cuando estas variaciones pueden estar en relación con el estado dinámico del circuito, no medible en estudios *post mortem* (Piffl *et al.* 2013). Por otra parte, la medición de la concentración de dopamina procede tanto de

axones dopaminérgicos DAT+ como de axones dopaminérgicos DAT- del tálamo, no estudiados en este trabajo, por lo que los datos estructurales cuantitativos de nuestro trabajo no son directamente comparables con los datos bioquímicos.

Por su parte, Freeman *et al.* observaron cualitativamente una disminución de fibras TH+ y fibras DAT+ en el tálamo, incluyendo en el núcleo R, de macacos tratados con MPTP. Este descenso coincidía, además, con la presencia de marcadores de degeneración axonal activa en el tálamo y de pérdida neuronal en los grupos dopaminérgicos mesencefálicos (Freeman *et al.* 2001). El protocolo de intoxicación con MPTP utilizado por dichos autores es diferente al utilizado en nuestro trabajo. Freeman *et al.* produjeron un parkinsonismo agudo mediante dosis de 0,4 mg/kg de MPTP con administración intracarotídea o intraestriatal. Este protocolo de intoxicación aguda podría explicar la denervación observada en el núcleo R, similar al animal parkinsoniano agudo de nuestro estudio, y en relación inversa al resto de nuestros animales tratados con protocolo de intoxicación crónica con MPTP (Figura 39). El protocolo de intoxicación aguda permite visualizar los cambios producidos por el efecto tóxico directo del MPTP sobre el sistema dopaminérgico; mientras que con el protocolo de intoxicación progresiva se genera un parkinsonismo crónico, poniendo de manifiesto cambios adaptativos, como puede ser el aumento de fibras DAT+ en el núcleo R que observamos en este estudio (Figuras 33 y 38A-B).

Estudios de neuroimagen han puesto de manifiesto cambios metabólicos en el tálamo que, junto a los cambios en estriado, pálido y corteza, apoyan la presencia de una disfunción del circuito mesotalamocorticoestriatal en el cerebro de pacientes con EP y en el modelo de MPTP en el mono (Porrino *et al.* 1987; Brownell *et al.* 2003; Matthews *et al.* 2018). No obstante, la caracterización de la afectación de la innervación dopaminérgica en el tálamo mediante neuroimagen es muy limitada. Estudios de neuroimagen muestran un descenso de los receptores dopaminérgicos D2 mediante PET (Kaasinen *et al.* 2003), y de la actividad presináptica de DAT utilizando ¹⁸F-CIT-PET (Brownell *et al.* 2003) en el tálamo medial de pacientes con EP respecto a controles sanos. Estas observaciones estarían en línea con la disminución de axones dopaminérgicos en el núcleo MD y en CnMd-Pf de nuestro estudio.

5. CONSECUENCIAS A NIVEL CELULAR DE LAS MODIFICACIONES EN CANTIDAD DE AXONES DAT+ EN EL TÁLAMO

Los efectos de la dopamina en el tálamo son complejos y heterogéneos dada: 1) la expresión de múltiples subtipos de receptores dopaminérgicos (D1-D5); 2) la distinta localización tanto nuclear como celular (interneuronas y neuronas de proyección) y subcelular (nivel pre o postsináptico) de los mismos; así como 3) sus distintos efectos en las conductancias iónicas y potenciales de membrana (Choi *et al.* 1995; Rieck *et al.* 2004; Missale *et al.* 2018).

La mayoría de información sobre la función de la dopamina a nivel del tálamo procede de trabajos *in vitro* en roedores, utilizando métodos farmacológicos y electrofisiológicos. Las conclusiones de estos estudios son diversas y heterogéneas. Por ejemplo, en el núcleo geniculado lateral la dopamina modula la respuesta de las neuronas talamocorticales a un estímulo visual, ya sea por la supresión o aumento de la actividad neuronal vía receptores D1 o D2 (Munsch *et al.* 2005). Mientras que, en el núcleo MD la dopamina produce un aumento de la excitabilidad de membrana y facilita la generación de espigas de bajo umbral (*Low Threshold Spikes*, LTS); efecto mediado por receptores dopaminérgicos D2 (Lavin and Grace 1998). La pérdida de innervación dopaminérgica en el núcleo MD modificaría la excitabilidad de las neuronas, y, en consecuencia, la actividad talamocortical podría verse afectada.

En el núcleo R hay un predominio de expresión de receptores dopaminérgicos D4. Los receptores D4 se expresan en las terminales de las fibras palidales que proyectan al núcleo R. En este núcleo, la dopamina reduce la liberación de GABA de las terminales palidales vía receptores dopaminérgicos D4, suprimiendo selectivamente la inhibición que dichas aferencias palidales ejercen en el núcleo R (Florán *et al.* 2004; Gasca-Martínez *et al.* 2010; Govindaiah *et al.* 2010). Esta des-inhibición de las neuronas gabaérgicas del núcleo R favorecería la acción inhibitoria sobre las neuronas de proyección talamocorticales. De esta manera, el efecto modulador de la dopamina en el núcleo R puede ser muy relevante en la comunicación intratalámica y talamocortical. Será interesante estudiar si, en el parkinsonismo por MPTP en primates, el aumento de axones que expresan DAT en el núcleo R se ve acompañado de aumento en la actividad de dopamina, y con ello de una modificación en la excitabilidad talamocortical.

6. IMPLICACIONES FUNCIONALES

La acción moduladora de la dopamina sobre las proyecciones talamocorticales en el núcleo MD es relevante por la relevante conexión de este núcleo con la corteza prefrontal, involucrada en funciones ejecutivas y de memoria operativa. La depleción dopaminérgica en el núcleo MD predomina en las regiones dorsales de este núcleo (Figura 30). La región dorsal del núcleo MD está conectada predominantemente con la corteza prefrontal dorsolateral y medial y con la corteza cingular anterior, de manera que la depleción dopaminérgica puede potencialmente afectar a la actividad talamocortical a ese nivel (Goldman-Rakic and Porrino 1985; Barbas *et al.* 1991).

Pacientes con lesiones en el núcleo MD muestran déficits similares a pacientes con lesiones en la corteza prefrontal, como inatención, impulsividad y fallos en memoria de trabajo (Mitchell 2015). Por otra parte, en monos tratados con MPTP sin síntomas motores, se ha descrito déficits de atención y de funciones ejecutivas (Schneider and Pope-Coleman 1995; Decamp and Schneider 2004), recordando, o de forma similar, a aquellos déficits que se observan en pacientes con EP en estadios iniciales de la enfermedad (Kehagia *et al.* 2010), y que sugieren una disfunción de la función de la corteza prefrontal dorsolateral y cingular anterior. Es razonable proponer que la actividad normal del núcleo MD es necesaria para mantener una función normal de la corteza prefrontal (Pergola *et al.* 2018) y que la disminución de dopamina en el MD afectaría a las funciones de la corteza prefrontal lateral y medial, así como de la cingular anterior, conectadas con él.

Por otra parte, estudios en animales y en humanos relacionan el funcionamiento del MD con el aprendizaje de nuevos olores y su discriminación (Tham *et al.* 2009). La alteración del procesamiento olfativo, que afecta a la detección, discriminación e identificación de olores, está presente en cerca del 90% de los pacientes con EP a lo largo de la evolución de la enfermedad (Doty 2012), incluso desde estadios muy iniciales (Ross *et al.* 2012). Dicha alteración se ha relacionado con la evolución de la enfermedad (Siderowf *et al.* 2005): la alteración olfativa puede preceder en años al desarrollo de síntomas motores, siendo la alteración de la discriminación de olores el aspecto que tiene mayor valor predictivo del desarrollo de EP (Ponsen *et al.* 2009).

Considerando la implicación del MD en discriminación olfativa y la frecuente alteración precoz de la discriminación en EP, puede proponerse que la denervación dopaminérgica del núcleo MD, que es precoz como demostramos en este trabajo, contribuya a los trastornos olfatorios del parkinsonismo.

El núcleo CnMd-Pf ha sido implicado en la fisiopatología de la EP y ha sido sugerido como una posible diana terapéutica para la neurocirugía funcional (Nanda *et al.* 2009; Stefani *et al.* 2009). Esto es debido a su distinta conectividad respecto a la mayoría de núcleos talámicos, pues inerva prácticamente en su totalidad el estriado y no la corteza cerebral (Parent and Parent, 2005). Además, las neuronas del CnMd-Pf degeneran en pacientes con EP y también en monos parkinsonizados con MPTP (Henderson *et al.* 2000a, 2000b; Halliday *et al.* 2005; Villalba *et al.* 2014). Esta degeneración neuronal ocurre en primates MPTP de forma temprana, no así la pérdida de innervación dopaminérgica del núcleo CnMd-Pf (Figura 36), por lo que la pérdida neuronal sería secundaria a otras causas.

La degeneración neuronal en el núcleo CnMd-Pf no es clara en roedores parkinsonianos (Aymerich *et al.* 2006; Kusnoor *et al.* 2012; Parker *et al.* 2016), en los cuales se ha descrito una hiperactividad de las neuronas talamoestriatales del núcleo CnMd-Pf (Aymerich *et al.* 2006). Resultaría interesante saber en qué medida este cambio de actividad es secundario a la propia neurodegeneración local o mediado por cambios en la innervación dopaminérgica del núcleo. En cualquier caso, en la condición parkinsoniana a la neurodegeneración celular se le une la pérdida de dopamina, lo cual puede contribuir al desarrollo de las manifestaciones motoras de la EP.

Estudios electrofisiológicos en el núcleo VL en macacos tratados con MPTP no muestran una disminución de la actividad talámica derivada del incremento de actividad en los núcleos de salida de los ganglios basales; pero sí una pérdida de la especificidad de respuesta de las neuronas talámicas ante la movilización pasiva de una o varias articulaciones de extremidades (Pessiglione *et al.* 2005). Esta pérdida de la segregación funcional está presente también en el globo pálido y STN (Taha *et al.* 1996; Levy *et al.* 2000; Baker *et al.* 2010). La disminución de la especificidad de respuesta de las neuronas talamocorticales se ha asociado a cambios en el sistema dopaminérgico talámico (Pessiglione *et al.* 2005). En nuestro estudio, no hemos objetivado cambios

cuantitativos en la densidad de axones dopaminérgicos en los núcleos ventrales del tálamo, considerados en su conjunto. Si bien, sí hemos observado algunos cambios en su distribución, por ejemplo en el VLo; por lo que un estudio detallado, individualizado, de los diversos núcleos ventrales, podría mostrar cambios en su innervación dopaminérgica. Cambios en la innervación dopaminérgica del núcleo VL podrían contribuir a la pérdida de la segregación funcional del circuito corteza-ganglios basales-tálamo.

Por otro lado, es relevante aludir a la importancia creciente del rol de la dopamina talámica en la génesis del temblor parkinsoniano. La dopamina en el núcleo VIM (VPLo) aumenta la inhibición talámica, produciendo disminución del temblor parkinsoniano (Dirkx *et al.* 2017). Sería interesante saber si existen cambios en la innervación dopaminérgica del núcleo VIM en la EP y si, de existir, obedecen a cambios en la expresión de dopamina o a cambios en el número de terminales dopaminérgicas, ya que no todos los pacientes con EP desarrollan temblor y, entre los que lo desarrollan, no todos responden de igual manera al tratamiento dopaminérgico (Dirkx *et al.* 2017, 2019).

La actividad inhibitoria del núcleo R tiene un efecto modulador sobre el resto de núcleos talámicos, siendo importante en la generación de la actividad rítmica talamocortical, involucrada en mecanismos de sueño y atención (Steriade *et al.* 1986; Crunelli *et al.* 2018). El incremento en la densidad de longitud de axones DAT+ en el núcleo R se localiza en la región anterior del núcleo (Figuras 27 y 28), la región que recibe proyecciones desde corteza prefrontal y motora (Zikopoulos and Barbas 2006, 2007). Además, esta región está conectada con los núcleos MD y VA los cuales también tienen una innervación dopaminérgica notable; esto es, axones DAT+ inervan regiones del núcleo R conectadas con núcleos talámicos que también son diana de axones DAT+. Los cambios en la innervación dopaminérgica en el núcleo R pueden influir sobre la actividad talamocortical e intratalámica al afectar la actividad de las neuronas gabaérgicas del núcleo R (Zikopoulos and Barbas 2007).

De manera relevante, la innervación por dopamina aumenta en las dos estructuras que tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad talamocortical: el núcleo R y el GPi (Gagnon *et al.* 2018). En ratas, R y Gp reciben innervación de dopamina de colaterales de la mismas neuronas de la sustancia negra (Anaya-Martinez *et al.* 2006; Cebrián and

Prensa 2010). El aumento de la innervación dopaminérgica en estos dos núcleos durante el parkinsonismo puede ser el resultado de mecanismos comunes, pudiendo representar un cambio neuroadaptativo con distintos efectos compensatorios contra la denervación dopaminérgica que ocurre en el estriado. Además, quedaría por estudiar si el papel de la innervación dopaminérgica en el núcleo R y resto de núcleos talámicos tiene una función redundante u opuesta, y con ello, cómo el descenso de innervación dopaminérgica en unos núcleos y el aumento de innervación dopaminérgica en el núcleo R influye en la funcionalidad del tálamo en el cerebro parkinsoniano.

VI. CONCLUSIONES

En este trabajo de Tesis se ha examinado cualitativamente y cuantitativamente la innervación dopaminérgica del tálamo de macacos por axones que expresan el transportador de dopamina (DAT) en un modelo de enfermedad de Parkinson inducido por intoxicación lenta con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

Las principales conclusiones son:

1. La innervación dopaminérgica del tálamo presenta cambios a lo largo del parkinsonismo experimental por MPTP. Los cambios se han constatado tanto de forma cualitativa como cuantitativa, ocurriendo de forma heterogénea en los distintos núcleos estudiados. Los cambios ocurren tanto en estadios pre-sintomáticos como en estadios sintomáticos desde el punto de vista motor.
2. En el núcleo dorsomediano existe una pérdida de innervación dopaminérgica que es precoz pues está ya presente en estadios asintomáticos, siendo progresivamente mayor y más intensa conforme avanzan los síntomas motores. La depleción dopaminérgica es más marcada en zonas dorsales del núcleo dorsomediano, que conectan con áreas prefrontales dorsales y con la corteza cingular anterior. La depleción dopaminérgica del núcleo dorsomediano correlaciona con el número de neuronas dopaminérgicas en los grupos mesencefálicos A9 y A10.
3. En el complejo centromediano-parafascicular existe una pérdida de innervación dopaminérgica que es significativa en estadios sintomáticos, es decir, en animales parkinsonianos moderados y graves. La porción parafascicular del complejo, preferentemente conectada con territorios límbicos y asociativos del estriado, es la más afectada por la denervación. La depleción dopaminérgica del núcleo centromediano-parafascicular correlaciona con el número de neuronas dopaminérgicas en los grupos mesencefálicos A9 y A10.
4. En el conjunto de los núcleos ventrales no se objetivaron cambios cuantitativos en la densidad de axones dopaminérgicos. No obstante, en el estudio cualitativo se observaron cambios en la distribución de axones dopaminérgicos en algunas regiones, como en el núcleo ventral lateral oral, donde se aprecia un aumento de axones

dopaminérgicos en estadios con síntomas motores.

5. En el núcleo reticular existe un aumento de la densidad de axones dopaminérgicos que sucede de forma progresiva a medida que aumenta el grado de parkinsonismo. El aumento de la innervación dopaminérgica se localiza en el polo anterior del núcleo reticular, la región más densamente innervada por dopamina, y conectada con áreas prefrontales y motoras, así como con el núcleo dorsomediano y núcleos ventrales del tálamo.

6. Considerando que las modificaciones en la innervación dopaminérgica del tálamo afectan a núcleos o porciones de núcleos talámicos conectados con las cortezas prefrontal, cingular anterior y motora, así como con el estriado y con el resto de núcleos talámicos, especulamos que tales modificaciones pueden explicar manifestaciones motoras y no motoras del parkinsonismo. En concreto, los déficits de atención y de función ejecutiva, que aparecen precozmente en la enfermedad de Parkinson y en el parkinsonismo experimental, pueden estar en relación con la denervación dopaminérgica, también precoz, en el núcleo dorsomediano. En la misma línea, los trastornos del sueño y atención que acontecen en pacientes con enfermedad de Parkinson pueden estar vinculados con el aumento de innervación dopaminérgica del núcleo reticular del tálamo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aarsland D, Brønnick K, Larsen JP, Tysnes OB, Alves G. 2009. Cognitive impairment in incident, untreated parkinson disease: The norwegian parkwest study. *Neurology*. 72:1121–1126.
- Agid Y. 1991. Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet*. 337:1321–1324.
- Akert K, Hartmann-von Monakow K. 1980. Relationships of precentral premotor and prefrontal cortex to the mediodorsal and intralaminar nuclei of the monkey thalamus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 40:7–25.
- Albanese A, Granata R, Gregori B, Piccardi MP, Colosimo C, Tonali P. 1993. Chronic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to monkeys: Behavioural, morphological and biochemical correlates. *Neuroscience*. 55:823–832.
- Alexander GE, Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*. 13:266–271.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. 1986. Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. *Annu Rev Neurosci*. 9:357–381.
- Anaya-Martinez V, Martinez-Marcos A, Martinez-Fong D, Aceves J, Erlij D. 2006. Substantia nigra compacta neurons that innervate the reticular thalamic nucleus in the rat also project to striatum or globus pallidus: implications for abnormal motor behavior. *Neuroscience*. 143:477–486.
- Andersen E, Dafny N. 1983. Dorsal raphe stimulation reduces responses of parafascicular neurons to noxious stimulation. *Pain*. 15:323–331.
- Antal M, Beneduce BM, Regehr WG. 2014. The substantia nigra conveys target-dependent excitatory and inhibitory outputs from the basal ganglia to the thalamus. *J Neurosci*. 34:8032–8042.
- Antonini A, Barone P, Marconi R, Morgante L, Zappulla S, Pontieri FE, Ramat S, Ceravolo MG, Meco G, Cicarelli G, Pederzoli M, Manfredi M, Ceravolo R, Mucchiut M, Volpe G, Abbruzzese G, Bottacchi E, Bartolomei L, Ciacci G, Cannas A, Randisi MG, Petrone A, Baratti M, Toni V, Cossu G, Del Dotto P, Bentivoglio AR, Abrignani M, Scala R, Pennisi F, Quatrone R, Gaglio RM, Nicoletti A, Perini M, Avarello T, Pisani A, Scaglioni A, Martinelli PE, Iemolo F, Ferigo L, Simone P, Soliveri P, Troianiello B, Consoli D, Mauro A, Lopiano L, Nastasi G, Colosimo C. 2012. The progression of non-motor symptoms in Parkinson's disease and their contribution to motor disability and quality of life. *J Neurol*. 259:2621–2631.
- Aosaki T, Graybiel AM, Kimura M. 1994. Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science*. 265:412–415.
- Asanuma C, Thach WT, Jones EG. 1983. Distribution of cerebellar terminations and their relation to other afferent terminations in the ventral lateral thalamic region of the monkey. *Brain Res*. 286:237–265.
- Aymerich MS, Barroso-Chinea P, Pérez-Manso M, Muñoz-Patiño AM, Moreno-Igoa M, González-Hernández T, Lanciego JL. 2006. Consequences of unilateral nigrostriatal denervation on the thalamostriatal pathway in rats. *Eur J Neurosci*. 23:2099–2108.
- Baker KB, Lee JYK, Mavinkurve G, Russo GS, Walter B, DeLong MR, Bakay RAE, Vitek JL. 2010. Somatotopic organization in the internal segment of the globus pallidus in Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 222:219–225.
- Ballard PA, Tetrad JW, Langston JW. 1985. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology*.

- 35:949–956.
- Barbas H, De Olmos J. 1990. Projections from the amygdala to basoventral and mediodorsal prefrontal regions in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 300:549–571.
- Barbas H, Henion THH, Dermon CR. 1991. Diverse thalamic projections to the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 313:65–94.
- Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J. 1987. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol.* 50:344–346.
- Berg D, Postuma RB, Adler CH, Bloem BR, Chan P, Dubois B, Gasser T, Goetz CG, Halliday G, Joseph L, Lang AE, Liepelt-Scarfone I, Litvan I, Marek K, Obeso J, Oertel W, Olanow CW, Poewe W, Stern M, Deuschl G. 2015. MDS research criteria for prodromal Parkinson’s disease. *Mov Disord.* 30:1600–1611.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci.* 20:415–455.
- Bezard E, Dovero S, Prunier C, Ravenscroft P, Chalon S, Guilloteau D, Crossman AR, Bioulac B, Brotchie JM, Gross CE. 2001. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson’s disease. *J Neurosci.* 21:6853–6861.
- Bezard E, Gross CE, Fournier MC, Dovero S, Bloch B, Jaber M. 1999. Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol.* 155:268–273.
- Bezard E, Imbert C, Deloivre X, Bioulac B, Gross CE. 1997. A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson’s disease: Evolution of motor symptoms in the monkey. *Brain Res.* 766:107–112.
- Bezard E, Jaber M, Gonon F, Boireau A, Bloch B, Gross CE. 2000. Adaptive changes in the nigrostriatal pathway in response to increased 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration in the mouse. *Eur J Neurosci.* 12:2892–2900.
- Birkmayer W, Birkmayer JD. 1987. Dopamine action and disorders of neurotransmitter balance. *Gerontology.* 33:168–171.
- Blesa J, Juri C, Collantes M, Peñuelas I, Prieto E, Iglesias E, Martí-Climent J, Arbizu J, Zubieta JL, Rodríguez-Oroz MC, García-García D, Richter JA, Cavada C, Obeso JA. 2010. Progression of dopaminergic depletion in a model of MPTP-induced Parkinsonism in non-human primates. An 18F-DOPA and 11C-DTBZ PET study. *Neurobiol Dis.* 38:456–463.
- Blesa J, Pifl C, Sánchez-González MÁ, Juri C, García-Cabezas MÁ, Adán R, Iglesias E, Collantes M, Peñuelas I, Sánchez-Hernández JJ, Rodríguez-Oroz MC, Avendaño C, Hornykiewicz O, Cavada C, Obeso JA. 2012. The nigrostriatal system in the presymptomatic and symptomatic stages in the MPTP monkey model: A PET, histological and biochemical study. *Neurobiol Dis.* 48:79–91.
- Blesa J, Przedborski S. 2014. Parkinson’s disease: Animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat.* 8:1–12.
- Blesa J, Trigo-Damas I, Dileone M, del Rey NL-G, Hernandez LF, Obeso JA. 2017. Compensatory mechanisms in Parkinson’s disease: Circuits adaptations and role in disease modification. *Exp Neurol.* 298:148–161.
- Bohnen N, Albin R. 2011. The cholinergic system in Parkinson’s disease. *Behav Brain Res.* 221:564–573.

- Bohnen NI, Müller MLTM, Koeppe RA, Studenski SA, Kilbourn MA, Frey KA, Albin RL. 2009. History of falls in Parkinson disease is associated with reduced cholinergic activity. *Neurology*. 73:1670–1676.
- Bowden DM, German DC, Poynter WD. 1978. An autoradiographic, semistereotaxic mapping of major projections from locus coeruleus and adjacent nuclei in *Macaca mulatta*. *Brain Res*. 145:257–276.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 24:197–211.
- Brandel JPA, Hirsch EC, Hersch LB, Javoy-Agid F. 1990. Compartmental ordering of cholinergic innervation in the mediodorsal nucleus of the thalamus in human brain. *Brain Res*. 515:117–125.
- Brooks D, Halliday GM. 2009. Intralaminar nuclei of the thalamus in Lewy body diseases. *Brain Res Bull*. 78:97–104.
- Brown RM, Crane AM, Goldman PS. 1979. Regional distribution of monoamines in the cerebral cortex and subcortical structures of the rhesus monkey: concentrations and in vivo synthesis rates. *Brain*. 168:133–150.
- Brownell A, Canales K, Chen YI, Jenkins BG, Owen C, Livni E, Yu M, Cicchetti F, Sanchez-pernate R, Isacson O. 2003. Mapping of brain function after MPTP-induced neurotoxicity in a primate Parkinson's disease model. *Neuroimage*. 20:1064–1075.
- Brozoski T, Brown R, Rosvold H, Goldman P. 1979. Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science*. 205:929–932.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. 1983. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci*. 80:4546–4550.
- Calzavara R, Zappalà A, Rozzi S, Matelli M, Luppino G. 2005. Neurochemical characterization of the cerebellar-recipient motor thalamic territory in the macaque monkey. *Eur J Neurosci*. 21:1869–1894.
- Cappe C, Morel A, Rouiller EM. 2007. Thalamocortical and the dual pattern of corticothalamic projections of the posterior parietal cortex in macaque monkeys. *Neuroscience*. 146:1371–1387.
- Caretti V, Stoffers D, Winogrodzka A, Isaias IU, Costantino G, Pezzoli G, Ferrarese C, Antonini A, Wolters EC, Booij J. 2008. Loss of thalamic serotonin transporters in early drug-naïve Parkinson's disease patients is associated with tremor: An [123I] β -CIT SPECT study. *J Neural Transm*. 115:721–729.
- Carpenter MB, Nakano K, Kim R. 1976. Nigrothalamic projections in the monkey demonstrated by autoradiographic technics. *J Comp Neurol*. 165:401–415.
- Cavada C, Compañy T, Hernández-González A, Reinoso-Suárez F. 1995. Acetylcholinesterase histochemistry in the macaque thalamus reveals territories selectively connected to frontal, parietal and temporal association cortices. *J Chem Neuroanat*. 8:245–257.
- Cebrián C, Prensa L. 2010. Basal ganglia and thalamic input from neurons located within the ventral tier cell cluster region of the substantia nigra pars compacta in the rat. *J Comp Neurol*. 1300:1283–1300.
- Chan-Palay V, Asan E. 1989. Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J Comp Neurol*. 287:373–392.

- Chen J, Zeng S, Rao Z, Shi J. 1992. Serotonergic projections from the midbrain periaqueductal gray and nucleus raphe dorsalis to the nucleus parafascicularis of the thalamus. *Brain Res.* 584:294–298.
- Chiba K, Trevor A, Castagnoli N. 1984. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 120:574–578.
- Choi WS, Machida CA, Ronnekleiv OK. 1995. Distribution of dopamine D1, D2, and D5 receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis. *Mol Brain Res.* 31:86–94.
- Cicirata F, Angaut P, Serapide MF, Panto MR. 1990. Functional organization of the direct and indirect projection via the reticularis thalami nuclear complex from the motor cortex to the thalamic nucleus ventralis lateralis. *Exp Brain Res.* 79:325–337.
- Ciliax BJ, Heilman C, Demchyshyn LL, Pristupa ZB, Ince E, Hersch SM, Niznik HB, Levey AI. 1995. The dopamine transporter: Immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci.* 15:1714–1723.
- Clascá F, Porrero C, Galazo MJ, Rubio-Garrido P, Evangelio M. 2016. Anatomy and development of multispecific thalamocortical axons. In: *Axons and Brain Architecture*. Elsevier. p. 69–92.
- Coudé D, Parent A, Parent M. 2018. Single-axon tracing of the corticosubthalamic hyperdirect pathway in primates. *Brain Struct Funct.* 223:3959–3973.
- Craven R. 2005. A new pathway to pathology? *Nat Rev Neurosci.* 6:665.
- Crunelli V, Lőrincz ML, Connelly WM, David F, Hughes SW, Lambert RC, Leresche N, Errington AC. 2018. Dual function of thalamic low-vigilance state oscillations: rhythm-regulation and plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 19:107–118.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. 1999. The substantia nigra of the human brain II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain.* 122:1437–1448.
- Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 39:889–909.
- Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. 2010. Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. *Neuron.* 66:646–661.
- Decamp E, Schneider JS. 2004. Attention and executive function deficits in chronic low-dose MPTP-treated non-human primates. *Eur J Neurosci.* 20:1371–1378.
- Den Hartog Jager WA, Bethlem J. 1960. The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 23:283–290.
- Dickson DW, Fujishiro H, Orr C, DelleDonne A, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Parisi JE, Klos KJ, Ahlskog JE. 2009. Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Park Relat Disord.* 15:1–5.
- Dirkx MF, den Ouden H, Aarts E, Timmer M, Bloem BR, Toni X, Helmich RC. 2016. The cerebral network of Parkinson's tremor: an effective connectivity fMRI study. *J Neurosci.* 36:5362–5372.
- Dirkx MF, Den Ouden HEM, Aarts E, Timmer MHM, Bloem BR, Toni I, Helmich RC. 2017. Dopamine controls Parkinson's tremor by inhibiting the cerebellar thalamus. *Brain.* 140:721–734.
- Dirkx MF, Zach H, van Nuland A, Bloem BR, Toni I, Helmich RC. 2019. Cerebral differences between dopamine-resistant and dopamine-responsive Parkinson's tremor. *Brain.* 1–14.
- Dorsey ER, Bloem BR. 2018. The Parkinson pandemic - A call to action. *JAMA*

- Neurol. 75:9–10.
- Doty RL. 2012. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 8:329–339.
- Dzirasa K, Ribeiro S, Costa R, Santos LM, Lin SC, Grosmark A, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG, Nicolelis MAL. 2006. Dopaminergic control of sleep-wake states. *J Neurosci.* 26:10577–10589.
- Ehringer H, Hornykiewicz O. 1960. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr.* 53–57.
- Erickson SL, Lewis DA. 2004. Cortical connections of the lateral mediodorsal thalamus in cynomolgus monkeys. *J Comp Neurol.* 473:107–127.
- Erickson SL, Melchitzky DS, Lewis DA. 2004. Subcortical afferents to the lateral mediodorsal thalamus in cynomolgus monkeys. *Neuroscience.* 129:675–690.
- Fearnley JM, Lees AJ. 1990. Striatonigral degeneration. A clinicopathological study. *Brain.* 113:1823–1842.
- Fenelon G, Francois C, Percheron G, Yelnik J. 1991. Topographic distribution of the neurons of the central complex (centre médian-parafascicular complex) and of other thalamic neurons projecting to the striatum in macaques. *Neuroscience.* 45:495–510.
- Fénelon G, François C, Percheron G, Yelnik J. 1990. Topographic distribution of pallidal neurons projecting to the thalamus in macaques. *Brain Res.* 520:27–35.
- Ferguson BR, Gao WJ. 2015. Development of thalamocortical connections between the mediodorsal thalamus and the prefrontal cortex and its implication in cognition. *Front Hum Neurosci.* 8:1–10.
- Florán B, Florán L, Erlij D, Aceves J. 2004. Activation of dopamine D4 receptors modulates [3H]GABA release in slices of the rat thalamic reticular nucleus. *Neuropharmacology.* 46:497–503.
- Foltynie T, Brayne CEG, Robbins TW, Barker RA. 2004. The cognitive ability of an incident cohort of Parkinson's patients in the UK. The CamPaIGN study. *Brain.* 127:550–560.
- Forno LS. 1996. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55:259–272.
- Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW. 1993. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol.* 60:600–608.
- Fox SH, Brotchie JM. 2010. The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future, *Progress in Brain Research.* Elsevier B.V.
- François C, Percheron G, Parent A, Sadikot AF, Fenelon G, Yelnik J. 1991. Topography of the projection from the central complex of the thalamus to the sensorimotor striatal territory in monkeys. *J Comp Neurol.* 305:17–34.
- Freeman A, Ciliax B, Bakay R, Daley J, Miller RD, Keating G, Levey A, Rye D. 2001. Nigrostriatal collaterals to thalamus degenerate in parkinsonian animal models. *Ann Neurol.* 50:321–329.
- Fujiyama F, Unzai T, Nakamura K, Nomura S, Kaneko T. 2006. Difference in organization of corticostriatal and thalamostriatal synapses between patch and matrix compartments of rat neostriatum. *Eur J Neurosci.* 24:2813–2824.
- Fukuda M, Barnes A, Simon ES, Holmes A, Dhawan V, Giladi N, Fodstad H, Ma Y, Eidelberg D. 2004. Thalamic stimulation for parkinsonian tremor: Correlation between regional cerebral blood flow and physiological tremor characteristics.

- Neuroimage. 21:608–615.
- Fuster JM, Alexander GE. 1971. Neuron activity related to short-term memory. *Science*. 173:652–654.
- Fuster JM, Alexander GE. 1973. Firing changes in cells of the nucleus medialis dorsalis associated with delayed response behavior. *Brain Res*. 61:79–91.
- Gagnon D, Eid L, Coudé D, Whissel C, Di Paolo T, Parent A, Parent M. 2018. Evidence for sprouting of dopamine and serotonin axons in the pallidum of parkinsonian monkeys. *Front Neuroanat*. 12:1–14.
- Gagnon D, Gregoire L, Di Paolo T, Parent M. 2016. Serotonin hyperinnervation of the striatum with high synaptic incidence in parkinsonian monkeys. *Brain Struct Funct*. 221:3675–3691.
- Galvan A, Smith Y. 2011. The primate thalamostriatal systems: Anatomical organization, functional roles and possible involvement in Parkinson's disease. *Basal Ganglia*. 1:179–189.
- García-Cabezas MÁ, Martínez-Sánchez P, Sánchez-González MÁ, Garzón M, Cavada C. 2009. Dopamine innervation in the thalamus: monkey versus rat. *Cereb Cortex*. 19:424–434.
- García-Cabezas MÁ, Rico B, Sánchez-González MÁ, Cavada C. 2007. Distribution of the dopamine innervation in the macaque and human thalamus. *Neuroimage*. 34:965–984.
- García-Fiñana M, Cruz-Orive LM. 2000. Fractional trend of the variance in Cavalieri sampling. *Image Anal Stereol*. 19:71–79.
- Gasca-Martinez D, Hernandez A, Sierra A, Valdiosera R, Anaya-Martinez V, Floran B, Erlij D, Aceves J. 2010. Dopamine inhibits GABA transmission from the globus pallidus to the thalamic reticular nucleus via presynaptic D4 receptors. *Neuroscience*. 169:1672–1681.
- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. 1999. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*. 56:33–39.
- Gerlach M, Gsell W, Kornhuber J, Jellinger K, Krieger V, Pantucek F, Vock R, Riederer P. 1996. A post mortem study on neurochemical markers of dopaminergic, GABA-ergic and glutamatergic neurons in basal ganglia-thalamocortical circuits in Parkinson syndrome. *Brain Res*. 741:142–152.
- Gibb WRG, Lees AJ. 1988. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 51:745–752.
- Giménez-Amaya JM, McFarland NR, De Las Heras S, Haber SN. 1995. Organization of thalamic projections to the ventral striatum in the primate. *J Comp Neurol*. 354:127–149.
- Goldman-Rakic PS, Brown RM. 1981. Regional changes of monoamines in cerebral cortex and subcortical structures of aging rhesus monkeys. *Neuroscience*. 6:177–187.
- Goldman-Rakic PS, Porrino LJ. 1985. The primate mediodorsal (MD) nucleus and its projection to the frontal lobe. *J Comp Neurol*. 242:535–560.
- González-Hernández T, Barroso-Chinea P, De La Cruz Muros I, Del Mar Pérez-Delgado M, Rodríguez M. 2004. Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. *J Comp Neurol*. 479:198–215.
- Govindaiah G, Wang T, Gillette MU, Crandall SR, Cox CL. 2010. Regulation of inhibitory synapses by presynaptic D4 dopamine receptors in thalamus. *J Neurophysiol*. 104:2757–2765.
- Greenfield JG, Bosaquent FD. 1953. The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J Neurol*

- Neurosurg Psychiatry. 16:213–226.
- Groenewegen HJ. 1988. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience*. 24:379–431.
- Guillery RW, Harting JK. 2003. Structure and connections of the thalamic reticular nucleus: Advancing views over half a century. *J Comp Neurol*. 463:360–371.
- Gundersen HJG, Jensen EB. 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 147:229–263.
- Haber SN, Ryoo H, Cox C, Lu W. 1995. Subsets of midbrain dopaminergic neurons in monkeys are distinguished by different levels of mRNA for the dopamine transporter: comparison with the mRNA for the D2 receptor, tyrosine hydroxylase and calbindin immunoreactivity. *J Comp Neurol*. 362:400–410.
- Halliday G, Herrero MT, Murphy K, McCann H, Ros-Bernal F, Barcia C, Mori H, Blesa FJ, Obeso JA. 2009. No Lewy pathology in monkeys with over 10 years of severe MPTP parkinsonism. *Mov Disord*. 24:1519–1523.
- Halliday GM. 2009. Thalamic changes in Parkinson's disease. *Park Relat Disord*. 15:152–155.
- Halliday GM, Blumbergs PC, Cotton RGH, Blessing WW, Geffen LB. 1990. Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res*. 510:104–107.
- Halliday GM, Macdonald V, Henderson JM. 2005. A comparison of degeneration in motor thalamus and cortex between progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease. *Brain*. 128:2272–2280.
- Hazrati LN, Parent A. 1991. Projection from the external pallidum to the reticular thalamic nucleus in the squirrel monkey. *Brain Res*. 550:142–146.
- Heckers S, Geula C, Mesulam M. 1992. Cholinergic innervation of the human thalamus: Dual origin and differential nuclear distribution. *J Comp Neurol*. 325:68–82.
- Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS, Duvoisin RC. 1984. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature*. 311:467–469.
- Henderson JM, Carpenter K, Cartwright H, Halliday GM. 2000a. Degeneration of the centre median-parafascicular complex in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 47:345–352.
- Henderson JM, Carpenter K, Cartwright H, Halliday GM. 2000b. Loss of thalamic intralaminar nuclei in progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease: clinical and therapeutic implications. *Brain*. 123:1410–1421.
- Hirsch EC, Graybiel AM, Agid Y. 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*. 334:345–348.
- Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ. 1993. A Clinicopathologic Study of 100 Cases of Parkinson's Disease. *Arch Neurol*. 50:140–148.
- Ilinsky IA, Jouandet ML, Goldman-Rakic PS. 1985. Organization of the nigrothalamocortical system in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 236:315–330.
- Ilinsky IA, Kultas-Ilinsky K. 1987. Sagittal cytoarchitectonic maps of the *Macaca mulatta* thalamus with a revised nomenclature of the motor-related nuclei validated by observations on their connectivity. *J Comp Neurol*. 262:331–364.
- Ilinsky IA, Kultas-Ilinsky K. 1990. Fine structure of the magnocellular subdivision of the ventral anterior thalamic nucleus (VAmc) of *Macaca mulatta*: I. Cell types and synaptology. *J Comp Neurol*. 294:455–478.

- Ilinsky IA, Yi H, Kultas-Ilinsky K. 1997. Mode of termination of pallidal afferents to the thalamus: A light and electron microscopic study with anterograde tracers and immunocytochemistry in *Macaca mulatta*. *J Comp Neurol*. 386:601–612.
- Imbert C, Bezard E, Boraud T, Gross CE. 2000. Comparison of eight clinical rating scales used for the assessment of MPTP-induced parkinsonism in the Macaque monkey. *J Neurosci Methods*. 96:71–76.
- Jankovic J, McDermott M, Carter J, Gauthier S, Goetz C, Golbe L, Huber S, Koller W, Olanow C, Shoulson I, Stern M, Tanner C, Weiner W. 1990. Variable expression of Parkinson's disease: A base-line analysis of the DATATOP cohort. *Neurology*. 40:1529–1529.
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. 1985. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:2173–2177.
- Jellinger KA. 1991. Pathology of Parkinson's disease - Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol*. 14:153–197.
- Jellinger KA. 1999. Post mortem studies in Parkinson's disease-is it possible to detect brain areas for specific symptoms? *J Neural Transm Suppl*. 56:1–29.
- Jones EG. 1975. Some aspects of the organization of the thalamic reticular complex. *J Comp Neurol*. 162:285–308.
- Jones EG. 1998. A new view of specific and nonspecific thalamocortical connections. *Adv Neurol*. 77:49–71; discussion 72-3.
- Jones EG. 2001. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci*. 24:595–601.
- Jones EG. 2007. *The Thalamus*. Second. ed. Cambridge University Press.
- Jones EG, Hendry SHC. 1989. Differential calcium binding protein immunoreactivity distinguishes classes of relay neurons in monkey thalamic nuclei. *Eur J Neurosci*. 1:222–246.
- Jones EG, Leavitt RY. 1974. Retrograde axonal transport and the demonstration of non-specific projections to the cerebral cortex and striatum from thalamic intralaminar nuclei in the rat, cat and monkey. *J Comp Neurol*. 154:349–377.
- Kaasinen V, Aalto S, Nägren K, Hietala J, Sonninen P, Rinne JO. 2003. Extrastriatal dopamine D2 receptors in Parkinson's disease: A longitudinal study. *J Neural Transm*. 110:591–601.
- Kalaitzakis ME, Gentleman SM, Pearce RKB. 2013. Disturbed sleep in Parkinson's disease: Anatomical and pathological correlates. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 39:644–653.
- Kalia L, Kalia S, McLean P, Lozano A, Lang A. 2013. α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann Neurol*. 73:155–169.
- Kalia L, Lang A. 2015. Parkinson's disease. *Lancet*. 386:896–912.
- Kehagia AA, Barker RA, Robbins TW. 2010. Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 9:1200–1213.
- Kim R, Nakano K, Jayaraman A, Carpenter MB. 1976. Projections of the globus pallidus and adjacent structures: An autoradiographic study in the monkey. *J Comp Neurol*. 169:263–289.
- Kish SJ. 2003. Biochemistry of Parkinson's disease. Is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? In: Gordin A., Kaakkoin S., Terävalnen H, editors. *Parkinson's Disease: Advances in Neurology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 30–48.

- Klaidman LK, Adams JD, Leung AC, Sam Kim S, Cadenas E. 1993. Redox cycling of MPP⁺: Evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med*. 15:169–179.
- Koller WC, Pahwa PR, Lyons KE, Wilkinson SB. 2000. Deep brain stimulation of the Vim nucleus of the thalamus for the treatment of tremor. *Neurology*. 55:S29-33.
- Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB, Chu Y, Beach TG, Adler CH, Halliday GM, Bartus RT. 2013. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain*. 136:2419–2431.
- Kreczmanski P, Heinsen H, Mantua V, Woltersdorf F, Masson T, Ulfing N, Schmidt-Kastner R, Korr H, Steinbusch HWM, Hof PR, Schmitz C. 2009. Microvessel length density, total length, and length per neuron in five subcortical regions in schizophrenia. *Acta Neuropathol*. 117:409–421.
- Künzle H. 1978. An autoradiographic analysis of the efferent connections from premotor and adjacent prefrontal regions (Areas 6 and 9) in macaca fascicularis. *Brain Behav Evol*. 15:201–234.
- Kurlan R, Kim MH, Gash DM. 1991. Oral levodopa dose-response study in MPTP-induced hemiparkinsonian monkeys: Assessment with a new rating scale for monkey parkinsonism. *Mov Disord*. 6:111–118.
- Kusnoor S V, Bubser M, Deutch AY. 2012. The effects of nigrostriatal dopamine depletion on the thalamic parafascicular nucleus. *Brain Res*. 1446:46–55.
- Kuusisto E, Parkkinen L, Alafuzoff I. 2003. Morphogenesis of Lewy Bodies: Dissimilar Incorporation of α -synuclein, ubiquitin, and p62. *J Neuropathol Exp Neurol*. 62:1241–1253.
- Langston J, Ballard P, Tetrud J, Irwin I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 219:979–980.
- Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*. 46:598–605.
- Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. 1984. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): Identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett*. 48:87–92.
- Langston JW, Palfreman J. 2014. The case of the frozen addicts. How the solution of a medical mystery revolutionized the understanding of Parkinson's disease. IOS Press.
- Larsen JO, Gundersen HJG, Nielsen J. 1998. Global spatial sampling with isotropic virtual planes: estimators of length density and total length in thick. *J Microsc*. 191:238–248.
- Lavin A, Grace AA. 1998. Dopamine modulates the responsivity of mediodorsal thalamic cells recorded in vitro. *J Neurosci*. 18:10566–10578.
- Lavoie B, Parent A. 1991. Serotonergic innervation of the thalamus in the primate: An immunohistochemical study. *J Comp Neurol*. 312:1–18.
- Lenz FA, Tasker RR, Kwam HC, Schnider S, Kwong R, Murayama Y, Dostrovsky JO, Murphy JT. 1988. Single unit analysis of the human ventral thalamic nuclear group: Correlation of thalamic “tremor cells” with the 3-6 Hz component of Parkinsonian tremor. *J Neurosci*. 8:754–764.
- Levy R, Hutchison WD, Lozano AM, Dostrovsky JO. 2000. High-frequency synchronization of neuronal activity in the subthalamic nucleus of Parkinsonian patients with limb tremor. *J Neurosci*. 20:7766–7775.
- Lewis DA, Melchitzky DS, Sesack SR, Whitehead RE, Auh S, Sampson A. 2001.

- Dopamine transporter immunoreactivity in monkey cerebral cortex: regional, laminar, and ultrastructural localization. *J Comp Neurol.* 136:119–136.
- Liu XB, Jones EG. 1999. Predominance of corticothalamic synaptic inputs to thalamic reticular nucleus neurons in the rat. *J Comp Neurol.* 414:67–79.
- Liu Y, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Prive GG, Eisenberg D, Brecha N, Edwards RH. 1992. A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell.* 70:539–551.
- Liu Y, Roghani A, Edwards RH. 1992. Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:9074–9078.
- Lohr KM, Masoud ST, Salahpour A, Miller GW. 2017. Membrane transporters as mediators of synaptic dopamine dynamics: implications for disease. *Eur J Neurosci.* 45:20–33.
- Luthman J, Fredriksson A, Sundström E, Jonsson G, Archer T. 1989. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res.* 33:267–277.
- Ma SY, Røyttä M, Rinne JO, Collan Y, Rinne UK. 1997. Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson's disease using disector counts. *J Neurol Sci.* 151:83–87.
- Manning KA, Wilson JR, Uhlrich DJ. 1996. Histamine-immunoreactive neurons and their innervation of visual regions in the cortex, tectum, and thalamus in the primate *Macaca mulatta*. *J Comp Neurol.* 373:271–282.
- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. 1984. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature.* 311:464–467.
- Marras C, Lang A. 2013. Parkinson's disease subtypes: Lost in translation?. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 84:409–415.
- Martinez-Martin P, Schapira AHV, Stocchi F, Sethi K, Odin P, MacPhee G, Brown RG, Naidu Y, Clayton L, Abe K, Tsuboi Y, MacMahon D, Barone P, Rabey M, Bonuccelli U, Forbes A, Breen K, Tluk S, Olanow CW, Thomas S, Rye D, Hand A, Williams AJ, Ondo W, Chaudhuri KR. 2007. Prevalence of nonmotor symptoms in Parkinson's disease in an international setting; study using nonmotor symptoms questionnaire in 545 patients. *Mov Disord.* 22:1623–1629.
- Masilamoni GJ, Bogenpohl JW, Alagille D, Delevich K, Tamagnan G, Votaw JR, Wichmann T, Smith Y. 2011. Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist protects dopaminergic and noradrenergic neurons from degeneration in MPTP-treated monkeys. *Brain.* 134:2057–2073.
- Masilamoni GJ, Groover O, Smith Y. 2017. Reduced noradrenergic innervation of ventral midbrain dopaminergic cell groups and the subthalamic nucleus in MPTP-treated parkinsonian monkeys. *Neurobiol Dis.* 100:9–18.
- Masilamoni GJ, Smith Y. 2017. Chronic MPTP administration regimen in monkeys: a model of dopaminergic and non-dopaminergic cell loss in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 125:337–363.
- Matelli M, Luppino G. 1996. Thalamic input to mesial and superior area 6 in the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 372:59–87.
- Matelli M, Luppino G, Fogassi L, Rizzolatti G. 1989. Thalamic input to inferior area 6 and area 4 in the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 280:468–488.
- Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T. 2009. Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci.* 29:444–453.

- Matthews DC, Lerman H, Lukic A, Andrews RD, Mirelman A, Wernick MN, Giladi N, Strother SC, Evans KC, Cedarbaum JM, Even-Sapir E. 2018. FDG PET Parkinson's disease-related pattern as a biomarker for clinical trials in early stage disease. *NeuroImage Clin.* 20:572–579.
- Mayer RA, Kindt M V, Heikkila RE. 1986. Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenylethylamine transport. *J Neurochem.* 47:1073–1079.
- McAlonan K, Cavanaugh J, Wurtz RH. 2006. Attentional modulation of thalamic reticular neurons. *J Neurosci.* 26:4444–4450.
- McFarland NR, Haber SN. 2000. Convergent inputs from thalamic motor nuclei and frontal cortical areas to the dorsal striatum in the primate. *J Neurosci.* 20:3798–3813.
- McFarland NR, Haber SN. 2001. Organization of thalamostriatal terminals from the ventral motor nuclei in the macaque. *J Comp Neurol.* 429:321–336.
- McFarland NR, Haber SN. 2002. Thalamic relay nuclei of the basal ganglia form both reciprocal and nonreciprocal cortical connections, linking multiple frontal cortical areas. *J Neurosci.* 22:8117–8132.
- McLardy T. 1948. Projection of the centromedian nucleus of the human thalamus. *Brain.* 71:290–303.
- Meissner W, Prunier C, Guilloteau D, Chalon S, Gross CE, Bezard E. 2003. Time-course of nigrostriatal degeneration in a progressive MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.* 28:209–218.
- Melchitzky DS, Lewis DA. 2001. Dopamine transporter-immunoreactive axons in the mediodorsal thalamic nucleus of the macaque monkey. *Neuroscience.* 103:1033–1042.
- Middleton FA, Strick PL. 2000. Basal ganglia output and cognition: Evidence from anatomical, behavioral, and clinical studies. *Brain Cogn.* 42:183–200.
- Miller GW, Staley JK, Heilman CJ, Perez JT, Mash DC, Rye DB, Levey AI. 1997. Immunochemical analysis of dopamine transporter protein in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 41:530–539.
- Minamimoto T, Hori Y, Kimura M. 2005. Complementary process to response bias in the centromedian nucleus of the thalamus. *Science.* 308:1798–1801.
- Minamimoto T, Kimura M. 2002. Participation of the thalamic CM-Pf complex in attentional orienting. *J Neurophysiol.* 87:3090–3101.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Dopamine MGC. 2018. Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol Rev.* 78:190–212.
- Mitchell AS. 2015. The mediodorsal thalamus as a higher order thalamic relay nucleus important for learning and decision-making. *Neurosci Biobehav Rev.* 54:76–88.
- Mitchell AS, Baxter MG, Gaffan D. 2007. Dissociable performance on scene learning and strategy implementation after lesions to magnocellular mediodorsal thalamic nucleus. *J Neurosci.* 27:11888–11895.
- Mitchell AS, Browning PGF, Wilson CRE, Baxter MG, Gaffan D. 2008. Dissociable roles for cortical and subcortical structures in memory retrieval and acquisition. *J Neurosci.* 28:8387–8396.
- Mitchell AS, Gaffan D. 2008. The magnocellular mediodorsal thalamus is necessary for memory acquisition, but not retrieval. *J Neurosci.* 28:258–263.
- Mitchell IJ, Cross AJ, Sambrook MA, Crossman AR. 1985. Sites of the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the macaque monkey include the ventral tegmental area and the locus coeruleus. *Neurosci Lett.* 61:195–

- 200.
- Moore RY, Halaris AE, Jones BE. 1978. Serotonin neurons of the midbrain raphe: Ascending projections. *J Comp Neurol.* 180:417–438.
- Moratalla R, Quinn B, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Graybiel AM. 1992. Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:3859–3863.
- Morrison JH, Foote SL. 1986. Noradrenergic and serotonergic innervation of cortical, thalamic, and tectal visual structures in old and new world monkeys. *J Comp Neurol.* 243:117–138.
- Mortensen O V, Amara SG. 2003. Dynamic regulation of the dopamine transporter. *Eur J Pharmacol.* 479:159–170.
- Mouton PR, Gokhale AM, Ward NL, West MJ. 2002. Stereological length estimation using spherical probes. *J Microsc.* 206:54–64.
- Mufson EJ, Mesulam MM. 1984. Thalamic connections of the insula in the rhesus monkey and comments on the paralimbic connectivity of the medial pulvinar nucleus. *J Comp Neurol.* 227:109–120.
- Munsch T, Yanagawa Y, Obata K, Pape H. 2005. Dopaminergic control of local interneuron activity in the thalamus. *Eur J Neurol.* 21:290–294.
- Nambu A, Tokuno H, Takada M. 2002. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal “hyperdirect” pathway. *Neurosci Res.* 43:111–117.
- Nanda B, Galvan A, Smith Y, Wichmann T. 2009. Effects of stimulation of the centromedian nucleus of the thalamus on the activity of striatal cells in awake rhesus monkeys. *Eur J Neurosci.* 29:588–598.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC. 2000. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci.* 23:185–215.
- Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. 2008. The human central nervous system: a synopsis and atlas. Fourth. ed. Springer.
- Nolte J. 2002. The human brain: An introduction to its functional anatomy, 5th edition. Mosby.
- Nussbaum RL, Ellis CE. 2003. Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease. *N Engl J Med.* 348:1356–1364.
- O’Sullivan SS, Williams DR, Gallagher DA, Massey LA, Silveira-Moriyama L, Lees AJ. 2008. Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson’s disease: A clinicopathological study. *Mov Disord.* 23:101–106.
- Oertel W, Schulz JB. 2016. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *J Neurochem.* 139:325–337.
- Ohye C, Saito Y, Fukamachi A, Narabayashi H. 1974. An analysis of the spontaneous rhythmic and non-rhythmic burst discharges in the human thalamus. *J Neurol Sci.* 22:245–259.
- Oke AF, Carver LA, Gouvion CM, Adams RN. 1997. Three-dimensional mapping of norepinephrine and serotonin in human thalamus. *Brain Res.* 763:69–78.
- Olszewski J. 1952. The thalamus of the macaca mulatta. An atlas for use with the stereotaxic instrument. Montrea: Karger.
- Padmanabhan S, Lambert NA, Prasad BM. 2008. Activity-dependent regulation of the dopamine transporter is mediated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase signaling. *Eur J Neurosci.* 28:2017–2027.
- Papadopoulos GC, Parnavelas JG. 1990. Distribution and synaptic organization of dopaminergic axons in the lateral geniculate nucleus of rats. *J Comp Neurol.*

- 294:356–361.
- Parent A, Paré D, Smith Y, Steriade M. 1988. Basal forebrain cholinergic and noncholinergic projections to the thalamus and brainstem in cats and monkeys. *J Comp Neurol.* 277:281–301.
- Parent M, Parent A. 2005. Single-axon tracing and three-dimensional reconstruction of centre médian-parafascicular thalamic neurons in primates. *J Comp Neurol.* 481:127–144.
- Parker PRL, Lalive AL, Kreitzer AC. 2016. Pathway-Specific Remodeling of Thalamostriatal Synapses in Parkinsonian Mice. *Neuron.* 89:734–740.
- Parkinson J. 1817. An essay on the shaking palsy. London: London Printed by Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely and Jones.
- Pérez-Santos I, Cavada C. 2016. Noradrenergic innervation of the primate thalamus. B004, Poster 679. In: Federation of European Neuroscience Societies (FENS). Copenhagen.
- Pergola G, Danet L, Pitel A-L, Carlesimo GA, Segobin S, Pariente J, Suchan B, Mitchell AS, Barbeau EJ. 2018. The regulatory role of the human mediodorsal thalamus. *Trends Cogn Sci.* 22:1011–1025.
- Pessiglione M, Guehl D, Rolland AS, François C, Hirsch EC, Féger J, Tremblay L. 2005. Thalamic neuronal activity in dopamine-depleted primates: Evidence for a loss of functional segregation within basal ganglia circuits. *J Neurosci.* 25:1523–1531.
- Pifl C, Bertel O, Schingnitz G, Hornykiewicz O. 1990. Extrastriatal dopamine in symptomatic and asymptomatic rhesus monkeys treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Neurochem Int.* 17:263–270.
- Pifl C, Hornykiewicz O, Blesa J, Adánez R, Cavada C, Obeso JA. 2013. Reduced noradrenaline, but not dopamine and serotonin in motor thalamus of the MPTP primate: relation to severity of Parkinsonism. *J Neurochem.* 125:657–662.
- Pifl C, Kish SJ, Hornykiewicz O. 2012. Thalamic noradrenaline in Parkinson's disease: Deficits suggest role in motor and non-motor symptoms. *Mov Disord.* 27:1618–1624.
- Pifl C, Schingnitz G, Hornykiewicz O. 1991. Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on the regional distribution of brain monoamines in the rhesus monkey. *Neuroscience.* 44:591–605.
- Plailly J, Howard JD, Gitelman DR, Gottfried JA. 2008. Attention to odor modulates thalamocortical connectivity in the human brain. *J Neurosci.* 28:5257–5267.
- Ponsen MM, Stoffers D, Twisk JWR, Wolters EC, Berendse HW. 2009. Hyposmia and executive dysfunction as predictors of future Parkinson's disease: A prospective study. *Mov Disord.* 24:1060–1065.
- Porrino LJ, Burns RS, Crane AM, Palombo E, Kopin IJ, Sokoloff L. 1987. Changes in local cerebral glucose utilization associated with Parkinson's syndrome induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) in the primate. *Life Sci.* 40:1657–1664.
- Postuma RB, Aarsland D, Barone P, Burn DJ, Hawkes CH, Oertel W, Ziemssen T. 2012. Identifying prodromal Parkinson's disease: Pre-Motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 27:617–626.
- Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G. 2015. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 30:1591–1601.
- Powell T, Cowan W. 1956. A study of thalamo-striate relations in the monkey. *Brain.*

- 79:364–390.
- Preuss TM, Goldman-Rakic PS. 1987. Crossed corticothalamic and thalamocortical connections of macaque prefrontal cortex. *J Comp Neurol.* 257:269–281.
- Raghanti MA, Stimpson CD, Marcinkiewicz JL, Erwin JM, Hof PR. 2008. Cholinergic innervation of the frontal cortex: Differences among humans, chimpanzees, and macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 424:409–424.
- Raju D V, Shah DJ, Wright TM, Hall RA, Smith Y. 2006. Differential synaptology of vGluT2-containing thalamostriatal afferents between the patch and matrix compartments in rats. *J Comp Neurol.* 499:231–243.
- Rieck RW, Ansari MS, Whetsell WO, Deutch AY, Kessler RM. 2004. Distribution of dopamine D2-like receptors in the human thalamus: autoradiographic and PET studies. *Neuropsychopharmacology.* 29:362–372.
- Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, Tanner CM, White LR. 2012. Pre-motor features of Parkinson's disease: the Honolulu-Asia aging study experience. *Parkinsonism Relat Disord.* 18:S199–S202.
- Rouiller EM, Tanne J, Moret V, Boussaoud D. 1999. Origin of thalamic inputs to the primary, premotor, and supplementary motor cortical areas and to area 46 in macaque monkeys: A multiple retrograde tracing study. *J Comp Neurol.* 409:131–152.
- Rüb U, Del Tredici K, Schultz C, Ghebremedhin E, De Vos RAI, Jansen Steur E, Braak H. 2002. Parkinson's disease: The thalamic components of the limbic loop are severely impaired by α -synuclein immunopositive inclusion body pathology. *Neurobiol Aging.* 23:245–254.
- Russchen FT, Amaral DG, Price JL. 1987. The afferent input to the magnocellular division of the mediodorsal thalamic nucleus in the monkey, *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol.* 256:175–210.
- Sadikot AF, Parent A, Francois C. 1990. The centre médian and parafascicular thalamic nuclei project respectively to the sensorimotor and associative-limbic striatal territories in the squirrel monkey. *Brain Res.* 510:161–165.
- Sadikot AF, Parent A, François C. 1992. Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey: A PHA-L study of subcortical projections. *J Comp Neurol.* 315:137–159.
- Sadikot AF, Parent A, Smith Y, Bolam JP. 1992. Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey: A light and electron microscopic study of the thalamostriatal projection in relation to striatal heterogeneity. *J Comp Neurol.* 320:228–242.
- Sakai ST, Stepniewska I, Qi HX, Kaas JH. 2000. Pallidal and cerebellar afferents to pre-supplementary motor area thalamocortical neurons in the owl monkey: A multiple labeling study. *J Comp Neurol.* 417:164–180.
- Sánchez-González MÁ, García-Cabezas MÁ, Rico B, Cavada C. 2005. The primate thalamus is a key target for brain dopamine. *J Neurosci.* 25:6076–6083.
- Sauer H, Oertel WH. 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience.* 59:401–415.
- Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y. 1983. Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res.* 275:321–328.
- Schapira AHV, Chaudhuri KR, Jenner P. 2017. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci.* 18:435–450.

- Schell GR, Strick PL. 1984. The origin of thalamic inputs to the arcuate premotor and supplementary motor areas. *J Neurosci.* 4:539–560.
- Schmahmann JD, Pandya DN. 1990. Anatomical investigation of projections from thalamus to the posterior parietal association cortices in rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 295:299–326.
- Schneider J., Pope-Coleman A. 1995. Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey. *Neurodegeneration.* 4:245–255.
- Schneider JS, Yuwiler A, Markham CH. 1987. Selective loss of subpopulations of ventral mesencephalic dopaminergic neurons in the monkey following exposure to MPTP. *Brain Res.* 411:144–150.
- Schrag A, Jahanshahi M, Quinn N. 2000. How does Parkinson's disease affect quality of life? A comparison with quality of life in the general population. *Mov Disord.* 15:1112–1118.
- Schultz W. 1998. Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol.* 80:1–27.
- Sherman SM, Guillery RW. 1998. On the actions that one nerve cell can have on another: Distinguishing “drivers” from “modulators.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7121–7126.
- Sherman SM, Guillery RW. 2006. Exploring the thalamus and its role in cortical function, 2nd ed. Cambridge, MA: MIT Press.
- Shibata H, Yuki M. 2003. Differential thalamic connections of the posteroventral and dorsal posterior cingulate gyrus in the monkey. *Eur J Neurosci.* 18:1615–1626.
- Shimada S, Kitayama S, Walther D, Uhl G. 1992. Dopamine transporter mRNA : dense expression in ventral midbrain neurons. *Mol Brain Res.* 13:359–362.
- Shu S, Ju G, Fan L. 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett.* 85:169–171.
- Siderowf A, Newberg A, Chou KL, Lloyd M, Colcher A, Hurtig HI, Stern MB, Doty RL, Mozley PD, Wintering N, Duda JE, Weintraub D, Moberg PJ. 2005. [^{99m}Tc]TRODAT-1 SPECT imaging correlates with odor identification in early Parkinson disease. *Neurology.* 64:1716–1720.
- Sidibé M, Bevan MD, Bolam JP, Smith Y. 1997. Efferent connections of the internal globus pallidus in the squirrel monkey: I. Topography and synaptic organization of the pallidothalamic projection. *J Comp Neurol.* 382:323–347.
- Sidibé M, Paré JF, Smith Y. 2002. Nigral and pallidal inputs to functionally segregated thalamostriatal neurons in the centromedian/parafascicular intralaminar nuclear complex in monkey. *J Comp Neurol.* 447:286–299.
- Sidibé M, Smith Y. 1996. Differential synaptic innervation of striatofugal neurones projecting to the internal or external segments of the globus pallidus by thalamic afferents in the squirrel monkey. *J Comp Neurol.* 365:445–465.
- Sirinathsinghji DJS, Kupsch A, Mayer E, Zivin M, Pufal D, Oertel WH. 1992. Cellular localization of tyrosine hydroxylase mRNA and cholecystokinin mRNA-containing cells in the ventral mesencephalon of the common marmoset: effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Mol Brain Res.* 12:267–274.
- Smith Y, Bennett BD, Bolam JP, Parent A, Sadikot AF. 1994. Synaptic relationships between dopaminergic afferents and cortical or thalamic input in the sensorimotor territory of the striatum in monkey. *J Comp Neurol.* 344:1–19.
- Smith Y, Villalba R. 2008. Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: An overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov Disord.* 23:534–547.

- Song DD, Haber SN. 2000. Striatal responses to partial dopaminergic lesion: Evidence for compensatory sprouting. *J Neurosci.* 20:5102–5114.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. 1998. α -synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:6469–6473.
- Stanton GB, Goldberg ME, Bruce CJ. 1988. Frontal eye field efferents in the macaque monkey: II. Topography of terminal fields in midbrain and pons. *J Comp Neurol.* 271:493–506.
- Stefani A, Peppe A, Pierantozzi M, Galati S, Moschella V, Stanzione P, Mazzone P. 2009. Multi-target strategy for Parkinsonian patients: The role of deep brain stimulation in the centromedian–parafascicularis complex. *Brain Res Bull.* 78:113–118.
- Stepniewska I, Preuss TM, Kaas JH. 1994. Architectonic subdivisions of the motor thalamus of owl monkeys: Nissl, acetylcholinesterase, and cytochrome oxidase patterns. *J Comp Neurol.* 349:536–557.
- Steriade M, Domich L, Oakson G. 1986. Reticularis thalami neurons revisited: activity changes during shifts in states of vigilance. *J Neurosci.* 6:68–81.
- Steriade M, Paré D, Parent A, Smith Y. 1988. Projections of cholinergic and non-cholinergic neurons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey. *Neuroscience.* 25:47–67.
- Taha JM, Favre J, Baumann TK, Burchiel KJ. 1996. Characteristics and somatotopic organization of kinesthetic cells in the globus pallidus of patients with Parkinson's disease. *J Neurosurg.* 85:1005–1012.
- Tanaka C, Ishikawa M, Shimada S. 1982. Histochemical mapping of catecholaminergic neurons and their ascending fiber pathways in the rhesus monkey brain. *Brain Res Bull.* 9:255–270.
- Tanibuchi I, Goldman-Rakic PS. 2003. Dissociation of spatial-, object-, and sound-coding neurons in the mediodorsal nucleus of the primate thalamus. *J Neurophysiol.* 89:1067–1077.
- Tham WWP, Stevenson RJ, Miller LA. 2009. The functional role of the medio dorsal thalamic nucleus in olfaction. *Brain Res Rev.* 62:109–126.
- Tham WWP, Stevenson RJ, Miller LA. 2011. The role of the mediodorsal thalamic nucleus in human olfaction. *Neurocase.* 17:148–159.
- Truong L, Brooks D, Amaral F, Henderson JM, Halliday GM. 2009. Relative preservation of thalamic centromedian nucleus in Parkinsonian patients with dystonia. *Mov Disord.* 24:2128–2135.
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. 2003. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 157:1015–1022.
- Van Der Werf YD, Jolles J, Witter MP, Uylings HBM. 2003. Contributions of thalamic nuclei to declarative memory functioning. *Cortex.* 39:1047–1062.
- Van Der Werf YD, Witter MP, Uylings HBM, Jolles J. 2000. Neuropsychology of infarctions in the thalamus: A review. *Neuropsychologia.* 38:613–627.
- Varastet M, Riche D, Maziere M, Hantraye P. 1994. Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience.* 63:47–56.
- Villalba RM, Wichmann T, Smith Y. 2014. Neuronal loss in the caudal intralaminar thalamic nuclei in a primate model of Parkinson's disease. *Brain Struct Funct.* 219:381–394.
- Vogt BA, Hof PR, Friedman DP, Sikes RW, Vogt LJ. 2008. Norepinephrinergic

- afferents and cytology of the macaque monkey midline, mediodorsal, and intralaminar thalamic nuclei. *Brain Struct Funct.* 212:465–479.
- Vogt BA, Pandya DN, Rosene DL. 1987. Cingulate cortex of the rhesus monkey: I. Cytoarchitecture and thalamic afferents. *J Comp Neurol.* 262:256–270.
- Vyas I, Heikkila RE, Nicklas WJ. 1986. Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurochem.* 46:1501–1507.
- Westlund KN, Sorkin LS, Ferrington DG, Carlton SM, Willcockson HH, Willis WD. 1990. Serotonergic and noradrenergic projections to the ventral posterolateral nucleus of the monkey thalamus. *J Comp Neurol.* 295:197–207.
- Wichmann T. 2018. Pathophysiologic basis of movement disorders. In: Nirajan A,, Lunsford L,, Richardson R, editors. *Current Concepts in Movement Disorder Management. Progress in Neurological Surgery.* Basel: Karger. p. 13–24.
- Wolters EC, Braak H. 2006. Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations. *J Neural Transm.* 70:309–319.
- Xuereb JH, Perry EK, Candy JM, Bonham JR, Perry RH, Marshall E. 1990. Parameters of cholinergic neurotransmission in the thalamus in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 99:185–197.
- Yang YC, Hu CC, Huang CS, Chou PY. 2014. Thalamic synaptic transmission of sensory information modulated by synergistic interaction of adenosine and serotonin. *J Neurochem.* 128:852–863.
- Yarita H, Iino M, Tanabe T, Kogure S, Takagi SF. 1980. A transthalamic olfactory pathway to orbitofrontal cortex in the monkey. *J Neurophysiol.* 43:69–85.
- Zarow C, Lyness SA, Mortimer JA, Chui HC. 2003. Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol.* 60:337–341.
- Zikopoulos B, Barbas H. 2006. Prefrontal projections to the thalamic reticular nucleus form a unique circuit for attentional mechanisms. *J Neurosci.* 26:7348–7361.
- Zikopoulos B, Barbas H. 2007. Circuits for multisensory integration and attentional modulation through the prefrontal and the thalamic reticular nucleus in primates. *Rev Neurosci.* 18:417–438.

VIII. ANEXOS

Tabla 1

Animal	Grupo	Núcleo dorsomediano			Complejo centromediano parafascicular			Núcleos ventrales			Núcleo reticular		
		Longitud total de axones DAT+ (m)	Volumen del núcleo (mm ³)	Densidad de longitud de axones DAT+ (m/mm ³)	Longitud total de axones DAT+ (m)	Volumen del núcleo (mm ³)	Densidad de longitud de axones DAT+ (m/mm ³)	Longitud total de axones DAT+ (m)	Volumen del núcleo (m/mm ³)	Densidad de longitud de axones DAT+ (m/mm ³)	Longitud total de axones DAT+ (m)	Volumen del núcleo (m/mm ³)	Densidad de longitud de axones DAT+ (m/mm ³)
M1	Control	126,91	45,00	2,82	9,66	20,06	0,48	177,29	128,20	1,38	16,61	56,64	0,29
M2	Control	22,47	25,00	0,90	5,06	14,18	0,36	38,44	116,00	0,33	7,07	33,50	0,21
M3	Control	92,43	40,80	2,27	8,65	20,67	0,42	70,17	151,80	0,46	6,28	50,66	0,12
M4	Control	53,89	48,40	1,11	7,23	19,26	0,38	71,95	161,20	0,45	11,75	46,05	0,26
M5	Asintomático	70,99	43,60	1,63	8,82	25,60	0,34	251,29	165,00	1,52	42,51	47,62	0,89
M6	Asintomático	65,96	53,20	1,24	15,22	28,61	0,53	91,96	162,40	0,57	28,53	55,87	0,51
M7	Asintomático	62,03	44,60	1,39	9,10	21,89	0,42	103,05	118,20	0,87	15,62	49,09	0,32
M8	Asintomático	53,23	45,00	1,18	9,00	22,30	0,40	61,86	131,00	0,47	11,42	35,74	0,32
M9	Recuperado	108,70	60,00	1,81	10,84	19,74	0,55	158,17	150,60	1,05	17,35	52,13	0,33
M10	Recuperado	73,67	38,80	1,90	7,42	23,49	0,32	148,58	145,60	1,02	29,21	52,48	0,56
M11	Recuperado	57,42	46,40	1,24	10,60	27,10	0,39	65,30	154,40	0,42	14,45	50,94	0,28
M12	Recuperado	57,91	60,20	0,96	5,67	23,33	0,24	92,49	156,80	0,59	19,62	66,72	0,29
M13	Moderado	65,15	43,00	1,52	4,60	25,54	0,18	134,61	134,40	1,00	20,31	54,05	0,38
M14	Moderado	54,62	48,80	1,12	4,83	23,58	0,20	91,21	151,20	0,60	18,82	50,59	0,37
M15	Moderado	66,53	43,80	1,52	11,82	18,75	0,63	264,87	148,80	1,78	55,74	50,43	1,11
M16	Moderado	55,51	51,00	1,09	2,99	21,15	0,14	143,04	143,00	1,00	36,44	44,77	0,81
M17	Grave	26,27	20,60	1,24	2,52	10,91	0,23	126,34	81,40	1,55			
M18	Grave	37,44	43,00	0,87	3,22	19,90	0,16	149,84	153,40	0,98	37,06	62,27	0,60
M19	Grave	37,49	56,40	0,66	3,96	23,33	0,17	124,27	181,80	0,68	28,19	69,02	0,41
M20	Grave	19,32	35,00	0,55	4,55	19,81	0,23	75,83	123,60	0,61	22,88	61,31	0,37
M21	Agudo	63,32	69,40	0,91	12,12	28,13	0,43	96,78	152,80	0,63	8,87	43,23	0,60

PROTOCOLOS EXPERIMENTALES:

PROTOCOLO 1: HISTOQUÍMICA DE ACETILCOLINESTERASA	
Primer día	
1. Agua destilada	<i>Tres lavados rápidos</i>
2. Solución de incubación¹	<i>24-36 horas (12 horas a 4°C, durante la noche)</i>
Segundo día	
3. Agua destilada	<i>Tres lavados rápidos</i>
4. Solución de sulfuro sódico²	<i>1 min (se puede variar ligeramente; en agitación)</i>
5. Agua destilada	<i>Tres lavados rápidos</i>
6. Solución de nitrato de plata³	<i>1 min (en agitación)</i>
7. Agua destilada	<i>Tres lavados rápidos</i>
8. Tiosulfato sódico⁴	<i>2 x 5 min</i>
9. Agua destilada	<i>Tres lavados rápidos</i>
10. PB	
11. Montaje	<i>En PB diluido 1/3</i>

¹Solución de incubación:

- Solución A: 300 mg de sulfato de cobre + 450 mg de glicina + 450 ml de agua destilada
- Solución B: 45 ml de ácido acético 0,2 M (0,5 ml de ácido acético glacial + 44,5 ml de agua destilada) + 105 ml de acetato sódico 0,2 M (2,8 g de acetato sódico + 105 ml de agua destilada)
- Mezclar A y B y ajustar a pH 5,0
- Añadir 0,696 g de acetilcolina iodide + 0,036 g de etopropacina. Agitar y sonicar hasta conseguir una dilución completa

²Solución de sulfuro de sodio (1%):

- 7,5 g de sulfuro sódico + 600 ml de agua destilada
- Ajustar el pH a 7,5 con HCl 35%

³Solución de nitrato de plata (1%):

- 2,5 g de nitrato de plata + 600 ml de agua destilada

⁴Solución de tiosulfato sódico (5%):

- 30 g tiosulfato sódico + 600 ml de agua destilada

PROTOCOLO 2: TINCIÓN DE NISL	
Primer día	
1. Montaje de los cortes En PB diluido 1/3	<i>Esperar 24 horas para que las secciones se sequen</i>
Segundo día	
2. Etanol 70%	<i>Toda una noche</i>
Tercer día	
3. Agua destilada	<i>Un lavado rápido</i>
4. Violeta de cresilo¹	<i>4-5 min (45°C en agitación)</i>
5. Agua destilada	<i>Dos lavados rápidos</i>
6. Etanol 70%	<i>30 seg – 1 min</i>
7. Etanol 96%	<i>30 seg – 1 min</i>
8. Cloroformo 100%	<i>10 min (en agitación)</i>
9. Etanol 96%	<i>Un lavado rápido</i>
10. Diferenciador²	<i>Control visual (en agitación)</i>
11. Etanol 100%	<i>Un lavado rápido</i>
12. Xylol	<i>9 x 5 min (Xylol limpio en cada paso)</i>
13. Cubrir las secciones	

¹Solución de Violeta de cresilo:

- 2,5 ml de ácido acético 10% + 500 ml de violeta de cresilo al 0,1% en agua destilada (esta última solución tiene que ser filtrada)

²Diferenciador:

- Para 1 litro: 17 ml de ácido acético glacial + 983 ml de etanol 96%

PROTOCOLO 3: INMUNOHISTOQUÍMICA FRENTE A TRANSPORTADOR DE DOPAMINA	
Primer día	
1.Lavado TBS 0,1M pH 7,6	<i>Un pase rápido</i>
2.Inactivación peroxidasa endógena 10% metanol, 10% H ₂ O ₂ en TBS	<i>2 x 10 min</i>
3.Lavados TB 0,1M pH 7,6	<i>Intenso 20 min</i>
4.Desenmascaramiento antigénico Tampón sodio citrato pH 6,0	<i>90°C, 60 min 60 min</i>
5.Lavados TBS	<i>3 x 15 min</i>
6.Preincubación 20% suero de conejo (NRS) + 5% BSA*, 0,4% Tx-100 en TBS *BSA: <i>Bovine Serum Albumin</i> – Albúmina de suero bovino	<i>3h, Tª ambiente</i>
7.Incubación con anticuerpo primario Monoclonal rat anti-DAT Chemicon MAB369 1:1000, en TBS-Tx 0,2%-NRS 20%-BSA 5% Control negativo: TBS-Tx 0,2%-NRS 20%-BSA 5%, sin anticuerpo primario	<i>60 h, 4°C en agitación</i>
Segundo día	
8.Lavados TBS	<i>2 x 10 min + 2 x 15 min</i>
9.Incubación en anticuerpo secundario Rabbit anti-rat biotinado (BA-4000, Vector Laboratories) 1:1000 en TBS-Tx 0,2%-NRS 20%-BSA* 5%	<i>2h, Tª ambiente con agitación</i>
10.Lavados TBS	<i>2 x 10 min + 2 x 15 min</i>
11.Incubación en estreptavidina ABC Elite (Vector) ABC en TBS (1 gota de A y 1 gota de B por cada 5 ml de solución)	<i>Preparar la solución de ABC 30 min antes de la incubación 45 min, Tª ambiente con agitación</i>
12.Lavados TBS	<i>2 x 15 min</i>

13.Revelado: reacción de glucosa oxidasa¹

Solución A: Tampón acetato 0,2 M, pH 6 con sulfato de Ni, D-glucosa y cloruro de amonio

Solución B: DAB con agua destilada
1,6 mg de glucosa oxidasa

*Bajo control microscópico
Tª ambiente, oscuridad, agitación 7-20 min*

14.Lavados

Primero TBS 0,1M pH 7,6

Resto PB 0,1M pH 7,4

5 x 5 min

15.Montaje

Montar los cortes sobre portaobjetos gelatinados en PB 0,1M diluido (1/3)

¹ Reacción de glucosa oxidasa:

- Solución A: 30 mL de tampón acetato 0,2M, pH6 + 1,45 g de sulfato de níquel + 0,12 g de D-glucosa + 0,024 g de cloruro de amonio
- Solución B: 28,8 mL de agua destilada + 12 mg de DAB
- Mezclar A y B con filtración y agitación continua. Ajustar a pH 5,0
- Añadir inmediatamente antes de usar 1,6 mg de glucosa oxidasa

PROTOCOLO 4: LIMPIEZA Y GELATINIZACIÓN DE PORTAOBJETOS

1.Lavar en lavaplatos sin detergente

2.Dejar secar en estufa 24 horas

3.Pasar por la solución de gelatina

Dos pases de unos segundos

4.Colocar en estufa a 37°C

Se pueden usar 24 horas después

¹ Solución de gelatina:

- Solución A: calentar 950 ml de agua destilada hasta 50-60°C y añadir lentamente 20 g de gelatina en polvo
- Solución B: disolver 0,5 g de *chromium potassium sulfate* en 50 ml de agua destilada
- Mezclar A y B, dejar enfriar y filtrar

PROTOCOLO 5: DESHIDRATACIÓN DE SECCIONES	
1.Etanol 70%	<i>3 min</i>
2.Etanol 80%	<i>3 min</i>
3.Etanol 96%	<i>3 min</i>
4.Etanol 100%	<i>2 x 3 min</i>
5.Xylol	<i>6 x10 min</i>

TAMPONES Y SOLUCIONES:**TAMPÓN TRIS / TRIS BUFFER (TB) 0,1 M pH 7,6**

Para 1 litro:

- Diluir 12,12 g de Tris-hidroximetil aminometano en 950 ml de agua destilada
- Ajustar el pH a 7,6 con HCL 35%
- Enrasar a 1 L con agua destilada

TAMPÓN TRIS SALINO / TRIS BUFFER SALINE (TBS) 0,1 M pH 7,6

Para 1 litro:

- Diluir 12,12 g de Tris-hidroximetil aminometano y 9,9 g de NaCl en 950 ml de agua destilada
- Ajustar el pH a 7,6 con HCL 35%
- Enrasar a 1 L con agua destilada

TAMPÓN FOSFATO / PHOSPHATE BUFFER (PB) 0,1 M pH 7,4

Para 1 litro:

- Solución A: 27,6 g de fosfato sódico monobásico + 1L de agua destilada
- Solución B: 35,6 g de fosfato sódico dibásico + 1L de agua destilada
- Mezclar: 115 ml de solución A + 385 ml de solución B (así se obtiene PB 0,2 M)
- Mezclar 500 ml de PB 0,2 M y 500 ml de agua destilada

TAMPÓN SODIO CITRATO pH 6,0

Para 1 litro:

- Preparar 100 ml de ácido cítrico 0,1 M: 2,1 g de ácido cítrico en 100 ml de agua destilada
- Preparar 500 ml de citrato sódico 0,1 M: 14,7 g de citrato de sodio en 500 ml de agua destilada
- Mezclar 95 ml de ácido cítrico 0,1 M y 415 ml de citrato sódico 0,1M
- Enrasar hasta 1 litro de agua destilada
- Ajustar el pH a 6,0 con hidróxido sódico

TAMPÓN ACETATO 0,2 M pH 6,0

Para 1 litro:

- Diluir 27,35 g de acetato sódico trihidrato en 1000 ml de agua bidestilada
- Ajustar el pH a 6,0 con ácido acético glacial
- Para obtener tampón acetato 0,1 M pH 6,0, diluir la solución anterior por su mismo volumen con agua destilada.

SOLUCIÓN CRIOPROTECTORA ANTICONGELANTE

Para 1 litro:

- 300 ml de glicerol + 300 ml de etilenglicol + 300 ml de agua destilada + 100 ml de tampón F (3,365 g fosfato sódico monobásico + 0,77 g de hidróxido sódico en lentes + 1 L de agua destilada)